

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR DERMATOLOGIE
Prof. Dr. Mark Berneburg
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Evaluierung neuer Photosensibilisatoren zur Inaktivierung
humanpathogener Mikroorganismen *in vitro/ex vivo***

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Friederike Wenk

2016

Meinen Eltern

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR DERMATOLOGIE
Prof. Dr. Mark Berneburg
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Evaluierung neuer Photosensibilisatoren zur Inaktivierung
humanpathogener Mikroorganismen *in vitro/ex vivo***

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Friederike Wenk

2016

Die vorliegende Arbeit entstand von März 2013 bis Januar 2016 an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie des Universitätsklinikums Regensburg.

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	PD Dr. Tim Maisch
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Uwe Ritter
Tag der mündlichen Prüfung:	08.06.2016

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	4
1.1	ANTIBIOTIKARESISTENZ und NOSOKOMIALE INFEKTIONEN.....	4
1.2	PHOTODYNAMISCHE INAKTIVIERUNG von BAKTERIEN	11
1.2.1	Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies für die PIB.....	12
1.2.2	Photosensibilisatoren.....	14
1.2.3	TMPyP	14
1.2.4	Bakterien.....	16
1.2.5	Schweinehautmodell.....	17
1.3	FRAGESTELLUNG.....	19
2	MATERIAL und METHODEN	20
2.1	BAKTERIENSTÄMME	20
2.2	CHEMIKALIEN	21
2.2.1	Photosensibilisatoren.....	21
2.2.2	Lösungsmittel.....	25
2.2.3	Kulturmedien	25
2.3	LICHTQUELLE und TECHNISCHES EQUIPMENT	26
2.3.1	Waldmann PIB 3000 (Vollspektrum > 400 nm)	26
2.3.2	Geräte.....	27
2.4	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	28
2.4.1	Bakterienstämme.....	28
2.4.2	Kulturbedingungen.....	28
2.4.3	Phototoxizitätstests <i>in vitro</i>	29
2.4.4	Phototoxizitätstests <i>ex vivo</i> Schweinehautmodell.....	30
2.5	DATENAUSWERTUNG.....	33
3	ERGEBNISSE	34
3.1	PHOTOTOXIZITÄTSTESTS <i>IN VITRO</i>	35
3.1.1	TMPyP	35
3.1.2	TPyP 8+A.....	38

3.1.3	TPyP 8+B	41
3.1.4	Dunkeltoxizität	43
3.2	PHOTOTOXIZITÄTSTESTS <i>IN VITRO</i> mit WASCHEN	46
3.2.1	TPyP	46
3.2.2	TPyP 8+A	48
3.2.3	TPyP 8+B	50
3.3	ZUSAMMENFASSUNG der <i>IN VITRO</i> EXPERIMENTE	52
3.4	PHOTOTOXIZITÄTSTESTS <i>EX VIVO</i> mit SCHWEINEHAUT	54
3.4.1	TPyP	54
3.4.2	TPyP 8+A	56
3.4.3	TPyP 8+B	57
3.5	ZUSAMMENFASSUNG der <i>EX VIVO</i> EXPERIMENTE	59
4	DISKUSSION	60
4.1	PHOTOTOXIZITÄTSTESTS <i>IN VITRO</i>	60
4.2	PHOTOTOXIZITÄTSTESTS <i>EX VIVO</i>	67
4.3	RESISTENZENTWICKLUNG gegenüber der PIB	73
5	ZUSAMMENFASSUNG	75
6	AUSBLICK	77
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	79
8	LITERATURVERZEICHNIS	82
9	ANHANG	89
9.1	RESISTENZPROFIL CIPROFLOXACIN RESISTENTER <i>Escherichia coli</i> (CIP)	89
9.2	GRAFISCHE DARSTELLUNGEN DER PHOTOTOXIZITÄTSTESTS <i>IN VITRO</i>	90
9.2.1	TPyP	90
9.2.2	TPyP 8+A	93
9.2.3	TPyP 8+B	96
	Danksagung	100
	Eidesstattliche Erklärung	101

1 EINLEITUNG

1.1 ANTIBIOTIKARESISTENZ und NOSOKOMIALE INFEKTIONEN

Seit der zufälligen Entdeckung des Penicillins 1928 durch Alexander Fleming [1] und dessen klinischen Einsatz seit den 1940er Jahren [2] glaubte man, bakterielle Infektionen besiegt zu haben. Durch die rasant steigende Resistenzentwicklung humanpathogener Keime sowie der abnehmenden Anzahl neu zugelassener Antibiotika sind Infektionskrankheiten wieder zu einer ernstzunehmenden Gefahr geworden [3]. Für das World Economic Forum ist die Resistenzentwicklung von Bakterien sogar das größte Risiko für unsere Gesundheit überhaupt [4]. Auf dem G7 Gipfel 2015 am 7. und 8. Juni auf Schloss Elmau spielte die Resistenzentwicklung von Antibiotika ebenfalls eine zentrale Rolle. In der Abschlusserklärung des G7 Gipfels heißt es: „Antibiotika spielen für die heutigen und zukünftigen Erfolge in der Human- und Veterinärmedizin eine entscheidende Rolle. Wir unterstützen uneingeschränkt den kürzlich beschlossenen globalen Aktionsplan der WHO zu Antibiotikaresistenzen. Wir werden unsere eigenen nationalen Aktionspläne erstellen oder überarbeiten und wirksam umsetzen und andere Staaten bei der Entwicklung ihrer jeweiligen nationalen Aktionspläne unterstützen. Wir bekennen uns nachdrücklich zu dem „One Health“-Ansatz, der alle Bereiche – die Gesundheit von Mensch und Tier sowie Landwirtschaft und Umwelt – einbezieht. Wir werden eine fachgerechte Verwendung von Antibiotika fördern und uns daran beteiligen, die Grundlagenforschung, die Forschung zu Epidemiologie, Infektionsprävention und -bekämpfung und die Entwicklung von neuen Antibiotika, alternativen Therapien, Impfstoffen und Schnelltests zu stärken. Wir sind entschlossen, bei der Erstellung oder Überarbeitung und der Bereitstellung unserer nationalen Aktionspläne den Annex (Gemeinsame Anstrengungen zur Bekämpfung von Antibiotikaresistenzen) zu berücksichtigen“ [5]. Diese Beschlüsse entsprechen auch den vier Punkten, welche zur Bekämpfung multiresistenter Keime im CDC (Centers for Disease Control and Prevention) Report 2013 veröffentlicht wurden [3]. In einer Erklärung veröffentlichte das Weiße Haus schon im März 2015 einen Nationalen Aktionsplan zur Bekämpfung Antibiotika-resistenter Bakterien, welcher bereits die in der Abschlusserklärung des Gipfels genannten Ziele beinhaltet [6]. Diese Beispiele zeigen, dass sich sogar die internationale Politik mit diesem Thema auseinandersetzt und untermauern die Brisanz dieser Entwicklung.

Antibiotikaresistenzen entstehen durch Selektionsdruck [7]; sowie durch die genetische Flexibilität von Bakterien, welche bis zu einem Viertel ihres Genoms mobilisieren können [8]. Mikroorganismen mit Resistenzgenen sind ubiquitär vorhanden; ihre Resistenzen sind ursprünglich durch spontane Mutationen entstanden. Wird nun ein Antibiotikum verschrieben, werden alle Keime abgetötet bis auf die Bakterien mit vorhandenen Resistenzgenen, die nun dominieren und sich vermehren können. Sie haben außerdem die Möglichkeit, diese Gene beispielsweise über Plasmide bei der Konjugation weiterzugeben, was die Resistenzentwicklung beschleunigt [9, 10]. Da Antibiotika nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip funktionieren, können solche Resistenzmechanismen die Veränderung der Zielstruktur sein, an die das Antibiotikum sich anlagert. Außerdem können manche Bakterien Enzyme bilden, die das Antibiotikum inaktivieren, wie es bei der Spaltung des Penicillins durch die β -Lactamase der Fall ist. Ein weiterer Mechanismus ist der aktive Efflux des Medikaments durch energieabhängige Pumpen [11]. Die Entwicklung von Resistenzen wird durch die unkritische Verschreibung von Antibiotika durch Ärzte, z.B. bei viralen Infekten, die unsachgemäße Verschreibung von Breitbandantibiotika, die falsche Wahl des Antibiotikums oder die mangelnde Compliance und fehlerhafte Anwendung auf Seiten der Patienten beschleunigt [12]. Weitere Gründe sind der Einsatz von Antibiotika in der Tierhaltung und Landwirtschaft sowie der zunehmende Einsatz antimikrobieller Mittel im Haushalt [10]. Ein großes Problem stellt außerdem die abnehmende Entwicklung neuer Antibiotika durch die Pharmaindustrie dar (siehe **Abb. 1.1**). In den 1980er Jahren wurden 16 neue Antibiotika zugelassen, 2008 – 2012 waren es nur noch zwei.

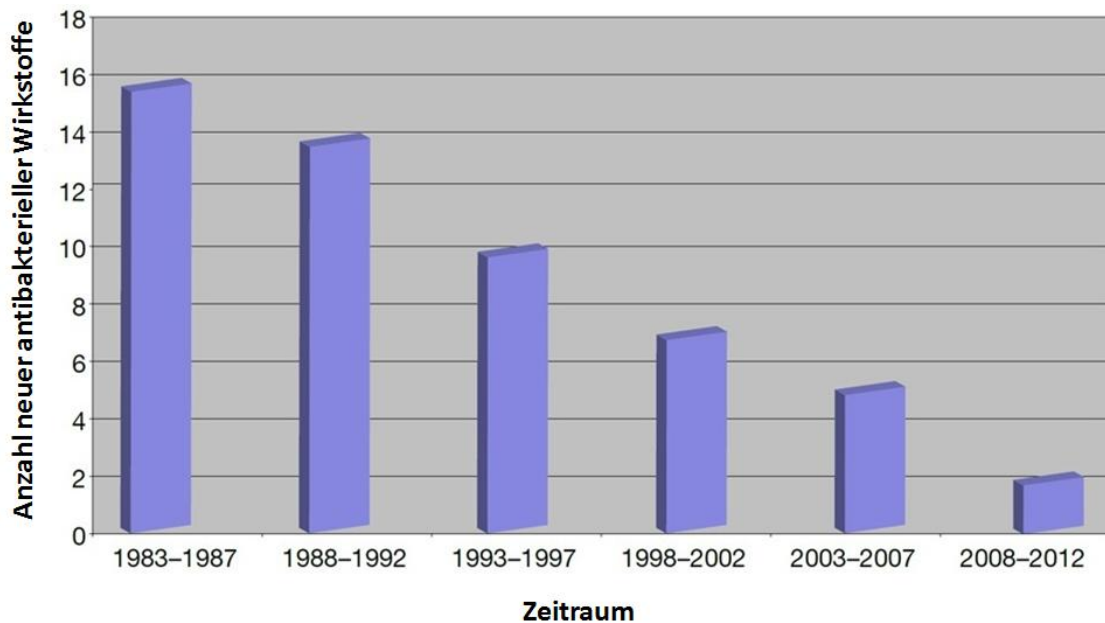


Abb. 1.1 Entwicklung neu zugelassener antibakterieller Medikamente 1983-2012 [modifiziert nach [13] aus[14]]

Von großer Relevanz in diesem Themenkomplex sind auch die sogenannten nosokomialen Infektionen. Das sind Infektionen, die nach Definition im kausalen Zusammenhang mit einem Krankenhausaufenthalt stehen [15]. Nach Hochrechnungen des Nationalen Referenzzentrums für Surveillance von nosokomialen Infektionen (NRZ) in dessen Projekt „Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System“ (KISS) erkrankten jährlich 57 900 Patienten auf Intensivstationen an nosokomialen Infektionen, vorrangig an Katheter-assoziierten Infektionen von zentralen Venenkathetern (ZVK), Harnwegskathetern oder bei invasiver Beatmung [16, 17]. Die Behandlung dieser Patienten wird bei einer Infektion durch einen Mangel an Therapieoptionen erschwert und bedeutet mehr Leiden und längere Liegezeiten für die Patienten sowie höhere Behandlungskosten [3, 10].

Eine wichtige Rolle bei nosokomialen Infektionen spielen der Gram-positive¹ Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), die Gram-negativen Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) und die Gram-negativen Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) Enterobakterien (*Escherichia coli* (*E. coli*) sowie *Klebsiella pneumoniae*) [10]. Der MRSA-Anteil bei Infektionen mit *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) lag 2013 europaweit bei 18 %, was einer Stabilisierung oder sogar einer Abnahme bei den multiresistenten Gram-positiven Bakterien entspricht. 2010 lag der durchschnittliche Anteil noch bei 22,2 %. Die Spannweite

¹ Bakterien werden anhand ihrer Unterschiede im Färbeverhalten durch den unterschiedlichen Aufbau ihrer Zellwand in Gram-positive sowie Gram-negative Bakterien eingeteilt (Gram-Färbung).

der Infektionen mit MRSA zwischen den verschiedenen europäischen Ländern schwankte jedoch von 0 % in Island bis hin zu 64,5 % in Rumänien. In Deutschland lag der MRSA-Anteil bei Infektionen mit *S. aureus* im europaweiten Mittelfeld, wie es die Karte in **Abb. 1.2** zeigt. Im Jahr 2013 entsprach der MRSA-Anteil 12,8 %; im Jahr 2010 lag er noch bei 20,9 % in Deutschland [18]. Zur gleichen Zeit waren 8,9 % der Erkrankungen mit *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) VRE, was einer Zunahme des VRE-Anteils seit 2012 entspricht [18]. Der Anteil an Infektionen mit Fluorchinolon-resistenten Gram-negativen *E. coli* lag europaweit im Jahr 2013 bei 22,5 %. Deutschland lag im selben Jahr mit 22,1 % wieder im Mittelfeld [18]. Besorgniserregend ist ebenfalls der Anstieg an Keimen mit kombinierten Resistenzen gegen 3^o Cephalosporine, Fluorchinolone und Aminoglykoside bei *E. coli* und *Klebsiella pneumoniae*, wie man der **Abb. 1.3** entnehmen kann [17, 19]. Des Weiteren wurden bereits Vancomycin-resistente MRSA-Stämme isoliert. Das Reserveantibiotikum Vancomycin wird hauptsächlich zur Behandlung von Infektionen mit MRSA eingesetzt. Im Jahr 1995 wurde in einer Publikation des Hong Kong Medical Journals noch konstatiert, dass Vancomycin gegen alle MRSA-Stämme wirkt [20]. Melo-Cristino *et al.* publizierten im Jahr 2013 den Fall der ersten MRSA-Infektion mit einer Vancomycin-Resistenz in Europa [21].

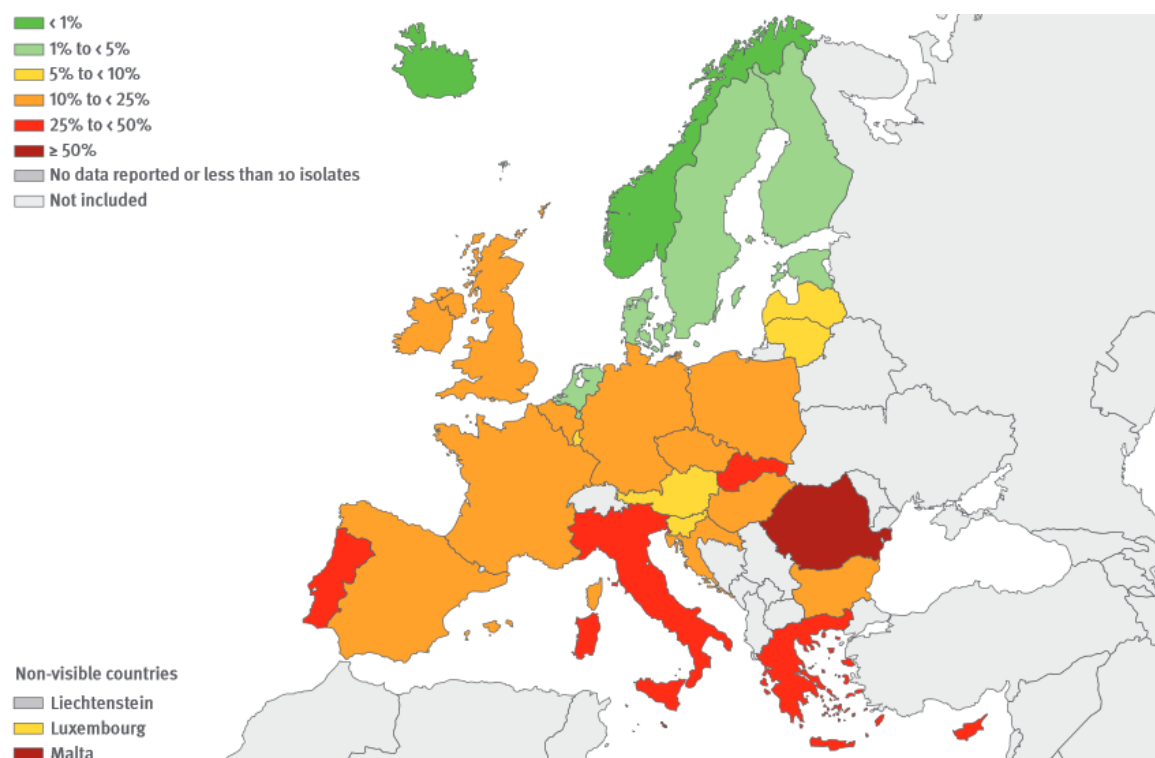


Abb. 1.2 Prozentanteil von MRSA-Isolaten in Europa 2013 [18]

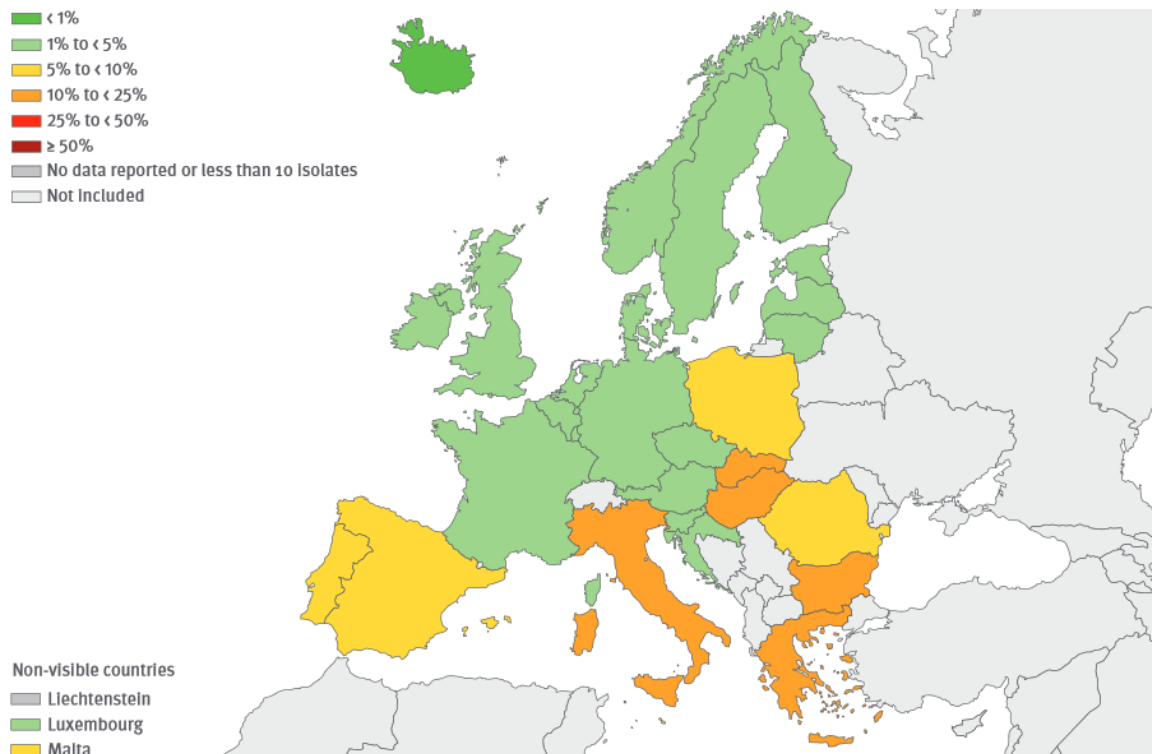


Abb. 1.3 Prozentanteil von *E. coli*-Isolaten mit kombinierten Resistenzen gegen 3^o Cephalosporine, Fluorchinolone sowie Aminoglykoside in Europa 2013 [18]

Auffällig ist in den **Abb. 1.2** und **1.3** ein deutliches Nord-Süd-Gefälle, was auf ein besseres Management der skandinavischen Länder mit multiresistenten Keimen zurückgeführt werden kann [22, 23].

Diese Zahlen spiegeln sich auch in den Schlagzeilen der aktuellen Presse wieder: **Tabelle 1.1** zeigt eine Auswahl an Artikeln aus den Online Portalen der Süddeutschen Zeitung (SZ.de), Spiegel Online (Spiegel.de) sowie Zeitonline (Zeit.de), welche allein in den ersten beiden Quartalen des Jahres 2015 in Zusammenhang mit der Resistenzentwicklung steht. Unabhängig von Hygieneskandalen wird dieses Thema praktisch wöchentlich aufgegriffen und in Artikeln dargestellt, was nochmals die Bedeutsamkeit der Thematik verdeutlicht.

Tab. 1.1: Auswahl an Artikeln der Quartale 01/2015 und 02/2015, die in Zusammenhang mit multiresistenten Keimen steht

Datum	Zeitschrift	Artikel
11.06.2015	SZ.de	Antibiotika-Strategie der Regierung: „Viele Dinge daran sind zweifelhaft“ [24]
06.06.2015	Spiegel.de	Pharma: Kapital gegen Keime [25]
02.06.2015	Spiegel.de	Studie zu Todesursachen: Resistente Keime bald gefährlicher als Krebs [26]
25.05.2015	Zeit.de	Gefährliche Keime: Sogar Erfolge werden verschwiegen [27]
23.05.2015	Spiegel.de	Lebensmittel: Hähnchenfleisch voller Keime [28]
13.05.2015	SZ.de	Antibiotika-Einsatz: Regierung beschließt Strategie gegen resistente Keime [29]
11.05.2015	Zeit.de	Antibiotika: Ungleiches Kampf zwischen Mensch und Mikrobe [30]
10.04.2015	Spiegel.de	Krankenhaushygiene: Tausende Todesfälle durch resistente Keime [31]
30.03.2015	SZ.de	Moderne Medizin in München: Süßer Verband gegen Keime [32]
23.03.2015	Zeit.de	Multiresistente Keime: Zögert nicht, es geht um Menschenleben [33]
20.03.2015	Spiegel.de	Infektionen: Wie Bakterien im Krankenhaus wandern [34]
31.01.2015	Spiegel.de	Schlimmer als Ebola und Vogelgrippe [35]
30.01.2015	Zeit.de	Keime im Krankenhaus: Für Gesunde harmlos, in Kliniken tödlich [36]
27.01.2015	SZ.de	Krankenhäuser: „Aktion gefragt“ gegen multiresistente Keime [37]

Die wichtigsten Gründe für die Übertragung nosokomialer Infektionen sind die Hände des medizinischen Personals [38, 39]. Je nach klinischer Tätigkeit sind sie vorübergehend mit infektionserregenden Keimen besiedelt, die bei erneutem Patientenkontakt ohne erfolgte Händedesinfektion weitergegeben werden können. Die Händehygiene nimmt einen sehr hohen Stellenwert für die Weltgesundheitsorganisation (WHO) ein, die die weltweite Kampagne „clean care is safer care“ ins Leben gerufen hat [40]. Besonders die Besiedelung mit MRSA steht im Vordergrund, dessen Dekolonisierung häufig nur mit Patientenisolierung, Einnahme des Reserveantibiotikums Vancomycin und hygienischen Maßnahmen möglich ist [41]. Die Patientenisolierung hat zudem noch den großen Nachteil, dass laut Gerd Fätkenheuer, Präsident der Deutschen Gesellschaft für Infektiologie, isolierten Patienten aufgrund des Aufwandes nicht die Behandlung zukommt, welche ihnen eigentlich zustehen würde [24]. Die Prävention der MRSA-Übertragung steht dementsprechend an erster Stelle, weswegen die Compliance des medizinischen Personals bezüglich der Händedesinfektion wichtig ist [42]. Durch eine ausreichende Händedesinfektion könnten bis zu 40 % aller Krankenhausinfektionen vermieden werden [40]. Des Weiteren ist die Keimübertragung auch durch Kontakt zwischen Patienten oder

über unbelebte Vektoren möglich. Darunter fallen unsterile Arbeitsgeräte und Instrumente sowie kontaminierte Arbeitsflächen, bei denen ebenfalls auf eine gute Desinfektion vor der Benutzung geachtet werden sollte [38].

Zusammenfassend ist es essenziell, die Ziele des G7 Gipfels 2015 in die Tat umzusetzen und somit einerseits die Grundlagenforschung sowie die Entwicklung neuer Antibiotika zu fördern und andererseits an alternativen Therapieansätzen zur Bekämpfung multiresistenter Keime zu arbeiten. Laut CDC Direktor Tom Frieden, MD, MPH, und der Generaldirektorin der WHO Margaret Chan, werden wir uns bald in einem postantibiotischen Zeitalter befinden [43, 44].

Ein neuer Ansatz der Forschung, um dieser Entwicklung zu begegnen, stellt die photodynamische Inaktivierung von Bakterien dar. Dabei handelt es sich um eine Möglichkeit, multiresistente Keime mittels der Kombination aus einem per se nicht-toxischen Farbstoff, Sauerstoff und Licht zu eradizieren.

1.2 PHOTODYNAMISCHE INAKTIVIERUNG von BAKTERIEN

Ein vielversprechender neuer Ansatz zur Bekämpfung multiresistenter Keime stellt die photodynamische Inaktivierung von Bakterien (PIB) dar. Dabei werden Mikroorganismen, wie Bakterien, Pilze, Parasiten und Viren mit einem photoaktiven Farbstoff (Photosensibilisator) in Kontakt gebracht, was in Kombination mit Sauerstoff und Licht aus dem sichtbaren Wellenlängenbereich zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führt [45]. Diese oxidieren daraufhin unspezifisch bakterielle Proteine, Lipide, Nukleinsäuren und andere zelluläre Komponenten, was letztlich zur Abtötung des Bakteriums führt [46-51]. Von den reaktiven Sauerstoffspezies kommt insbesondere Singulett-Sauerstoff (1O_2) eine zentrale Rolle bei der PIB zu [51, 52]. Die photodynamische Reaktion wurde bereits im Jahr 1900 von Oscar Raab beschrieben, der mittels Licht und dem Farbstoff Acridinorange den Einzeller *Paramecium caudatum* abtötete [53]. Professor Hermann von Tappeiner, der Doktorvater Oscar Raabs und Direktor des Pharmakologischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität in München, führte Experimente über die Phototoxizität auf menschlicher Haut mit einem eosinhaltigen Farbstoff durch und prägte den Begriff der „photodynamischen Reaktion“. Die Arbeitsgruppe um Tappeiner und Raab fand außerdem heraus, dass bei der photodynamischen Reaktion die Anwesenheit von Sauerstoff erforderlich ist [54, 55].

Der Einsatz von Licht, insbesondere von Sonnenlicht für therapeutische Zwecke geht geschichtlich noch weiter zurück und wurde bereits vor 3000 Jahren von Ägyptern, Indern und Chinesen beschrieben [56]. Die Inder setzten schon 1400 v. Chr. die Samen der Pflanze *Psoralea corylifolia* bei Vitiligo ein. Psoralene sind photoaktive Komponenten dieser Samen, die auch heute noch bei dieser Krankheit angewandt werden [57]. Bei den Ägyptern wurde bei Vitiligo die Pflanze *Ammi majus*, die ebenfalls Psoralene enthält, eingesetzt [56]. Die Photodynamik wurde zunächst jedoch nicht zur Inaktivierung von Mikroorganismen eingeführt, wie es beim ersten Versuch Oscar Raabs der Fall war, sondern als photodynamische Therapie (PDT) in der Onkologie [58]. Weitere Einsatzgebiete sind die Augenheilkunde [59] und in der Dermatologie die Behandlung der aktinischen Keratose sowie des Basalzellkarzinoms [60]. Des Weiteren wird die PDT zur Behandlung von Tumoren der Lunge [61] und des Gastrointestinaltrakts [59] eingesetzt. Erst in letzter Zeit wurde die Photodynamik wieder als antimikrobielle photodynamische Therapie zur photodynamischen Inaktivierung von Bakterien (PIB) für die Prävention von Infektionen entdeckt, worauf nun der Fokus der Forschung gelegt wird [62, 63]. In der Zahnheilkunde

wird am Einsatz der Photodynamik zur Behandlung von bakteriellen Infektionen und Pilzinfektionen mit oralen Biofilmen geforscht [63-67]. Ein weiteres Forschungsgebiet ist der Einsatz der photodynamischen Inaktivierung zur Kontrolle von Biofilmen aus anderen Bereichen der Medizin, unter anderem bei der Infektion von Kathetern und Prothesen [63, 68-70].

1.2.1 Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies für die PIB

Bei der photodynamischen Inaktivierung von Bakterien (PIB) wird ein photoaktiver Farbstoff, der Photosensibilisator (PS), mittels Licht (400-700 nm) vom Grundzustand (S_0) über den ersten angeregten S_1 -Zustand zum langlebigeren Triplett-Zustand (T_1) angeregt. Die Wellenlänge des Lichts kann hierbei dem Absorptionsmaximum des PS entsprechen [71]. Der Triplett-Zustand kehrt nun in den Grundzustand zurück, wobei reaktive Sauerstoffspezies (ROS: *reactive oxygen species*) entstehen können.

Die Generierung von ROS durch einen PS-Triplett-Zustand kann durch zwei verschiedene Wege stattfinden, der sogenannten Typ I und der Typ II Reaktion. Bei der Typ I Reaktion nach der Klassifikation von Schenck und Gollnick interagieren PS und O_2 direkt über Wasserstoffatom- oder Elektronentransfer miteinander [72]. Es entstehen Sauerstoff-Radikale wie das Superoxidanion oder das Hydroxylradikal. Die Typ II Reaktion erfolgt über direkten Energietransfer vom Triplett-Zustand des PS zu molekularem O_2 , woraus Sauerstoff im elektronisch angeregten Singulett-Zustand entsteht: Singulett-Sauerstoff 1O_2 [73, 74]. Die Besonderheit beim molekularen Sauerstoff ist, dass sein Grundzustand ein Triplett-Zustand ist, weswegen er sich nach Anregung im hochreaktiven Singulett-Zustand befindet. Die Typ II Reaktion spielt in der Photodynamik bei den meisten PS eine übergeordnete Rolle im Vergleich zu der Typ I Reaktion [51]. Durch 1O_2 und andere reaktive Sauerstoffspezies kann es zur unspezifischen Oxidation von Biomolekülen kommen; 1O_2 weist je nach Umgebung nur eine geringe Diffusionsreichweite auf, beispielsweise 200 nm in H_2O ohne weitere Zusätze [75, 76]. Die Toxizität von 1O_2 gegenüber Bakterien wurde durch Dahl *et al.* bestätigt, indem er in seinen Experimenten durch eine physikalische Barriere den PS von den Bakterien trennte, wodurch eine direkte Interaktion zwischen diesen beiden verhindert wurde. Zudem wurde die Möglichkeit einer Typ I Reaktion eliminiert; somit konnte nur noch 1O_2 für die Inaktivierung der Bakterien verantwortlich sein [77]. Ein Vorteil der Generierung von Singulett-Sauerstoff beruht auch auf der Tatsache, dass sich Singulett-Sauerstoff chemisch nicht vom molekularen Triplett-Grundzustand unterscheidet; es liegt lediglich ein unterschiedliches Energieniveau vor. Daher scheint es

unwahrscheinlich, dass es zu einer Resistenzbildung gegen Singulett-Sauerstoff kommen könnte [78].

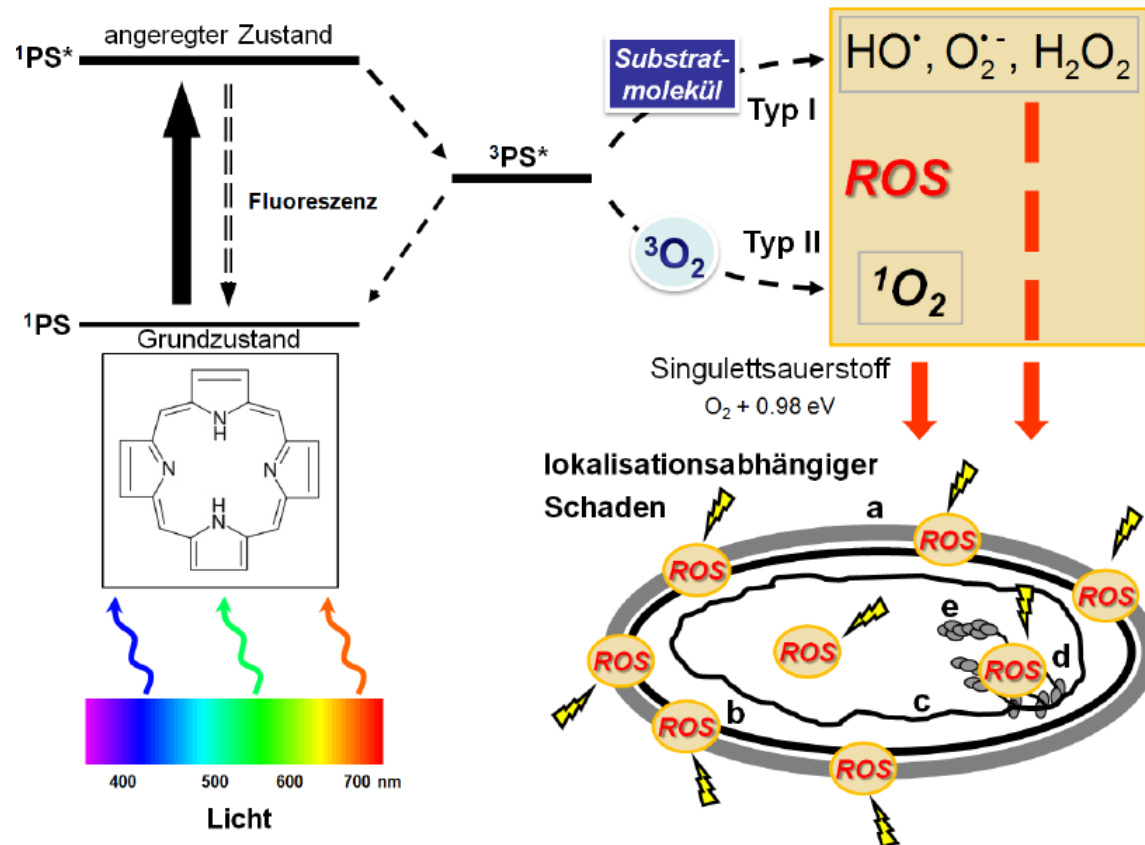


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der photodynamischen Inaktivierung von Bakterien:

Der PS, hier als nicht-substituiertes Porphin ($C_{20}H_{14}N_4$) dargestellt, wird durch Belichtung aus dem sichtbaren Wellenlängenbereich aus seinem Singulett-Grundzustand 1PS in den angeregten Singulett-Zustand $^1PS^*$ überführt. Von dort kehrt er entweder über Energieabgabe, z.B. durch Wärme oder Fluoreszenz in den Grundzustand 1PS zurück oder er tritt in den angeregten Triplett-Zustand $^3PS^*$ über. Dieser agiert als Mediator für die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies bei Typ I und Typ II Reaktionen.

Typ I-Reaktion: Durch Ladungsübertragung auf ein Substratmolekül werden Radikale oder Radikationen, wie das Hydroxylradikal ($HO\cdot$), das Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$) oder Sekundärprodukte wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) erzeugt.

Typ II-Reaktion: Durch Energieübertragung auf den Triplett-Grundzustand des Sauerstoffs (3O_2) erfolgt die Bildung des hochreaktiven Singulett-Sauerstoffs (1O_2).

Die ROS wirken in ihrer unmittelbaren Umgebung oxidierend auf die bakteriellen Strukturen und Prozesse ein, z.B. auf a) äußere Zellwand, b) Zytoplasmamembran, c) DNS-Replikation, d) Transkription oder e) Translation [modifiziert nach [79]].

1.2.2 Photosensibilisatoren

Photosensibilisatoren sind Moleküle, die Licht absorbieren können. Sie haben zwei Systeme elektronisch angeregter Zustände: Singulett- und angeregte Triplett-Zustände. Die geeignetsten PS mit einem langlebigen Triplett-Zustand sind diejenigen, die eine hohe Quantenausbeute vorweisen. Die Quantenausbeute bezeichnet die Anzahl umgesetzter Singulett-Sauerstoff-Moleküle pro Anzahl absorbierter Photonen bei der Bestrahlung mit Licht. Zeigt der PS nun eine hohe Quantenausbeute, wird umso mehr Energie auf molekularen Sauerstoff übertragen und mehr Singulett-Sauerstoff generiert [74]. Photosensibilisatoren können Moleküle aus der Gruppe der Phenothiazine sein, wie beispielsweise Methylenblau oder Toluidinblau. Es kommen auch Moleküle mit einer Tetrapyrrolringstruktur, wie Phthalocyanine oder Porphyrine in Frage. Neutrale oder anionische PS zeigen bei Gram-negativen Bakterien oftmals gar keine Phototoxizität, bei Gram-positiven Bakterien hingegen schon [80]. Kationische PS hingegen zeigen einen guten phototoxischen Effekt gegen Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien [80]. Die bessere Wirkung der positiv geladenen PS bei Gram-negativen Bakterien im Gegensatz zur schlechten Wirkung von neutralen oder negativ geladenen PS ist vermutlich durch die elektrostatische Anziehung zwischen dem positiv geladenen Farbstoff und der negativ geladenen Bakterienzellwand bedingt [81-84]. In der Zellwand Gram-negativer Bakterien finden sich negativ geladene Lipopolysaccharide, an die sich positive geladene Farbstoffe besser anlagern können [85]. Die Unterscheidung zwischen Gram-positiven sowie Gram-negativen Bakterien ist insofern wichtig, da bereits gezeigt worden ist, dass Bakterien unterschiedlicher Gram-Färbung durch die Unterschiede im Aufbau der Wandstruktur ein differenziertes Verhalten auf die Farbstoffe und somit auf die photodynamische Inaktivierungseffizienz zeigen [51]. Um für die PIB auf menschlicher Haut eingesetzt werden zu können, darf der PS als wichtige Voraussetzung keine kurz- oder langfristige schädigende Wirkung auf die Haut haben, keine oder nur eine geringe Dunkeltoxizität aufweisen und das Farbstoffmolekül darf nicht in der Haut akkumulieren. Zudem ist eine rasche Ausscheidung aus dem Organismus erforderlich [86].

1.2.3 TMPyP

In dieser Arbeit wurden von unserer Arbeitsgruppe neu synthetisierte, kationische Photosensibilisatoren aus der chemischen Gruppe der Porphyrine untersucht. Als Referenzfarbstoff wurde TMPyP verwendet, ein Porphyrinderivat, das schon erfolgreich als

Photosensibilisator *in vitro* getestet wurde und eine nahezu gleiche Wirksamkeit bei Gram-positiven wie auch bei Gram-negativen Bakterien zeigt [80, 87]. So konnten *Bacillus atrophaeus*, *Staphylococcus aureus* und MRSA (Gram-positiv) einerseits und auch *Escherichia coli* und EHEC (enterhämorrhagischer *Escherichia coli*, Gram-negativ) andererseits erfolgreich inaktiviert werden. Zudem wurden mit TMPyP auch die von *Bacillus cereus* gebildeten Endosporen photodynamisch eradiziert [88-90].

Die Grundstruktur der Porphyrine besteht aus vier Pyrrol-Ringen, die über vier Methingruppen zyklisch miteinander verbunden sind und den sogenannten Porphin-Ring bilden (siehe **Abb. 1.5**). Die bekanntesten Vertreter sind der Pflanzenfarbstoff Chlorophyll sowie das Häm im Hämoglobin, das für den Transport des Sauerstoffs im Blut verantwortlich ist [91].

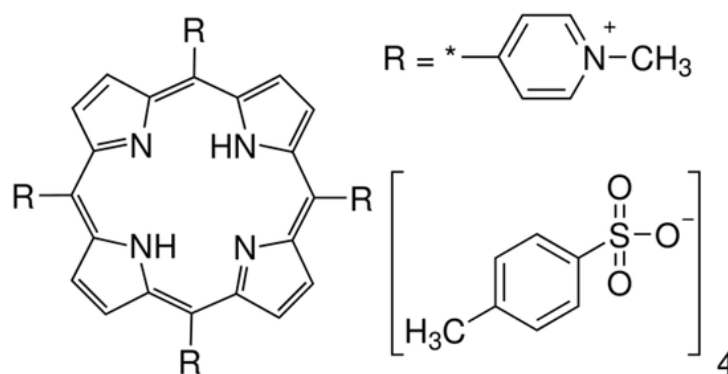


Abb. 1.5: TMPyP-Struktur: Grundstruktur der Porphyrine bestehend aus vier Pyrrol-Ringen, die über vier Methingruppen miteinander verbunden sind (Porphin-Ring $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_4$, siehe rechts). Linke Seite: R = funktionelle Gruppen (N-Methyl-pyridinium-Gruppen) von TMPyP mit vier positiven Ladungen mit Tosylat-Anionen als Gegenion [92].

TMPyP ist aufgrund mehrerer Eigenschaften ein häufig eingesetzter Farbstoff im Rahmen der PIB: Er hat eine hohe Photostabilität, da sich das Molekül unter der Bestrahlung nicht verändert [93]. Laut Redmond *et al.* hat TMPyP zudem eine hohe Quantenausbeute von 0.74 [94], was von Frederiksen *et al.* mit 0.77 ± 0.04 [95] in H_2O bestätigt wurde. Des Weiteren hat TMPyP vier positive Ladungen an seinen funktionellen Gruppen, weswegen er als kationischer PS unabhängig von der Gram-Färbung eine gute Wirkung gegen Bakterien zeigt [80].

Eichner *et al.* zeigten, dass selbst bei kürzesten Inkubations- und Bestrahlungszeiten von jeweils 10 s mit TMPyP eine effektive Inaktivierung von Keimen möglich ist. Es zeigte sich auch, dass der Farbstoff bei den untersuchten Konzentrationen keine Dunkeltoxizität aufwies, also eine Inkubation der Bakterien mit dem PS alleine ohne Belichtung nicht zu einer Abtötung der Keime führte [88].

Fluoreszenzmikroskopisch ließ sich nachweisen, dass sich TMPyP (Wasser-Ethanol-Gemisch 9:1) nur im Stratum corneum, der äußersten nicht vitalen Zellschicht der Haut, anlagert und nicht durch die Haut in den Organismus gelangt, siehe **Abb. 1.6** [88]. Somit können gewebstoxische und systemische Nebenwirkungen gegenwärtig ausgeschlossen werden.

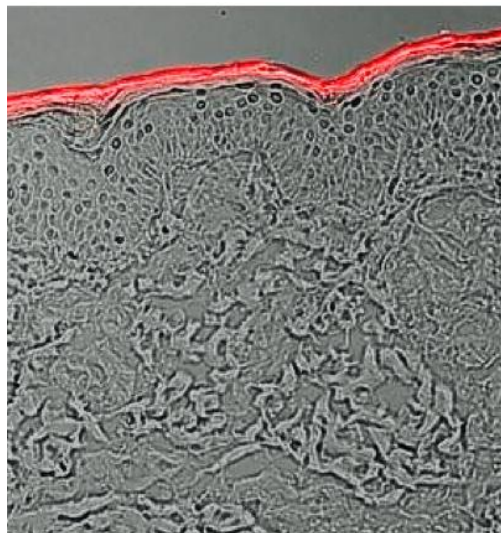


Abb. 1.6: Lokalisation von TMPyP am Stratum corneum eines Schweinehautmodells [88]

1.2.4 Bakterien

S. aureus und *E. coli* sind Prokaryonten, die Gram-positive und Gram-negative Stämme repräsentieren. Diese zeigen auf Grund der Unterschiede ihrer Zellwandstruktur ein unterschiedliches Färbeverhalten (Gram-Färbung). Der unterschiedliche Aufbau der Bakterienzellwand zur Zellmembran eukaryotischer Zellen ist vorteilhaft in Bezug auf ein mögliches therapeutisches Fenster für die Anwendung der PIB zur Haut- oder Wunddesinfektion, da sich gezeigt hat, dass menschliche Keratinozyten gegenüber dem photodynamischen Prozess weniger suszeptibel sind als Bakterien [87].

1.2.5 Schweinehautmodell

Für die Untersuchung neuer Photosensibilisatoren mit noch unbekanntem Toxizitätsprofil ist es ethisch nicht vertretbar, diese neuen Farbstoffe *in vivo* zu testen. Es hat sich jedoch gezeigt, dass die photodynamische Effektivität in Suspensionsversuchen *in vitro* ein anderes Verhalten aufzeigt als auf Hautmodellen [96]. Deswegen ist die Notwendigkeit gegeben, auf *ex vivo* Hautmodelle zurückzugreifen, um die Wirkung der PIB in Hinblick auf eine spätere klinische Anwendung, beispielsweise zur MRSA-Dekolonisierung zu testen.

In dieser Arbeit wurden Vollhautproben vitaler Schweinehaut als *ex vivo* Hautmodell zur Erprobung der PIB untersucht. Das Schweinehautmodell hat sich bereits vielfach als dermatologisches *ex vivo* Hautmodell etabliert [97-99]. Meyer *et al.* konnten lichtmikroskopisch zeigen, dass die Schichtung der Epidermis der Schweinehaut der Epidermis der menschlichen Haut gleicht und somit als Hautmodell geeignet ist. Außerdem zeigt Schweinehaut neben dem gleichen Aufbau auch gleiche Eigenschaften in Hinsicht auf die Histologie, Physiologie sowie Permeabilität [98].

Die menschliche Haut wie auch die Schweinehaut besteht aus drei Schichten: der Epidermis, der Dermis sowie der Subcutis. Die Epidermis wiederum unterteilt sich von außen nach innen in das Stratum corneum, das Stratum lucidum, das Stratum granulosum, das Stratum spinosum sowie das Stratum basale, siehe **Abb. 1.7**.

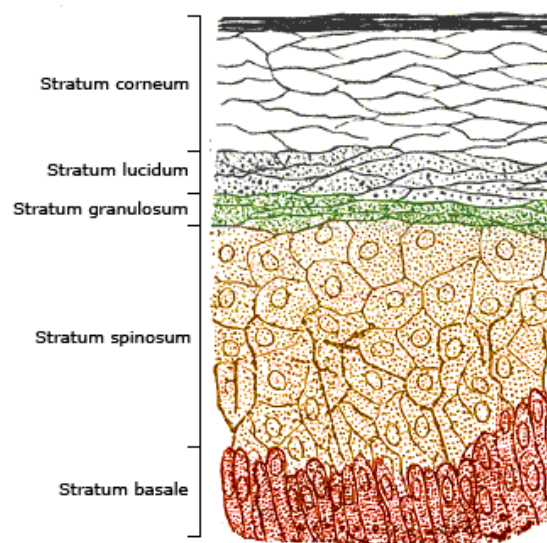


Abb. 1.7: Zellschichten menschlicher Epidermis [100]

Das *ex vivo* Schweinehautmodell wurde von dieser Arbeitsgruppe bereits im Rahmen von Untersuchungen zur photodynamischen Therapie (PDT) mit 5-Alpha-Aminolävulinsäure etabliert, einer Aminosäure, die sich vermehrt in Tumorzellen anreichert und dort zu dem Porphyrin Protoporphyrin IX umgesetzt wird [101, 102]. Zudem konnten Maisch *et al.* erfolgreich den Photosensibilisator XF73, ein zweifach positiv geladenes Porphyrin zur Eradizierung von MRSA testen [96, 101]. Die Eradizierung von MRSA in der Nasenschleimhaut ist von besonderem Interesse, da dieser Keim eine relevante Rolle bei nosokomialen Infektionen spielt [103].

1.3 FRAGESTELLUNG

Die Zielsetzung dieser Arbeit war die Untersuchung der Effektivität einer neuen Generation von TMPyP-Derivaten, Photosensibilisatoren aus der Gruppe der Porphyrin-Derivate. Als Referenzphotosensibilisator wurde TMPyP verwendet, ein Farbstoff der bereits häufig und erfolgreich im Rahmen der Photodynamik eingesetzt wurde [89]. TMPyP hat vier positive Ladungen an seinen funktionellen Gruppen, den N-Methyl-pyridinium-Gruppen. Es stellte sich die Frage, ob bei einer neuen Generation von TMPyP-Derivaten mit acht positiven Ladungen im Vergleich zu dem Referenzfarbstoff eine Wirkoptimierung erzielt werden könnte. Die Voraussetzung für eine desinfizierende Wirkung auf Oberflächen oder auf der Haut ist eine Keimreduktion von mindestens fünf \log_{10} -Stufen [104]. Die zwei neuen TMPyP-Derivate, TPyP 8+A sowie TPyP 8+B, mit jeweils acht positiven Ladungen wurden im Rahmen von *in vitro* Experimenten in Suspension mit *S. aureus*, MRSA, *E. coli* sowie Ciprofloxacin-resistenten *E. coli* untersucht und die photodynamische Inaktivierungseffizienz dieser neuen PS mit der photodynamischen Inaktivierungseffizienz von TMPyP verglichen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden beide neuen Photosensibilisatoren und deren photodynamische Inaktivierungseffizienz im Vergleich mit der Inaktivierungseffizienz von TMPyP auf dem *ex vivo* Schweinehautmodell untersucht. In früheren Experimenten der Arbeitsgruppe wurde das *ex vivo* Schweinehautmodell bereits als Modell für die humandermatologische Forschung etabliert [101]. Ziel des Schweinehautmodells war es, Grundlagenforschung für eine zukünftige klinische Anwendung, wie beispielsweise der Dekolonisierung des Nasen-Rachenraums von MRSA mittels des photodynamischen Prozesses zu betreiben.

2 MATERIAL und METHODEN

2.1 BAKTERIENSTÄMME

Staphylococcus aureus (S. aureus)

Staphylococcus aureus (ATCC 25923) wurde als Gram-positiver Antibiotika-sensibler Mikroorganismus ausgewählt.

Escherichia coli (E. coli)

Escherichia coli (ATCC 25922) wurde als Gram-negativer Antibiotika-sensibler Keim ausgesucht.

Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus (MRSA)

Der MRSA-Stamm (ATCC BAA-44) wurde als Beispiel für einen Gram-positiven Antibiotika-resistenten Mikroorganismus untersucht.

Ciprofloxacin-resistenter Escherichia coli (CIP)

Ein klinisches Isolat eines Ciprofloxacin-resistenten *Escherichia coli* wurde als Beispiel zur Untersuchung eines Gram-negativen Keims ausgewählt. Das Resistenzprofil ist im Anhang **9.1** in der **Tabelle 9.1** dargestellt.

2.2 CHEMIKALIEN

2.2.1 Photosensibilisatoren

TMPyP

Der Photosensibilisator (PS) 5,10,15,20-Tetrakis(1-methyl-4-pyridinio) – porphyrin tetra(p-toluenesulfonate), bekannt als *TMPyP*, siehe **Abb. 2.1**, hat eine molare Masse von $MW = 684.77 \text{ g mol}^{-1}$ ohne Gegenionen und $MW = 1363.63 \text{ g mol}^{-1}$ mit Gegenionen. Bei den Gegenionen handelt es sich um Tosylat-Anionen. Der Reinheitsgrad liegt bei $\geq 97 \%$. Der PS stammt von Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) und wurde als Referenzphotosensibilisator verwendet. Es handelt sich um ein Porphyrinderivat mit vier positiv geladenen Pyridinringen, die an den zentralen Porphinring binden. *TMPyP* zeigt laut Manuel Kraus sowohl eine hohe Photostabilität als auch eine hohe Quantenausbeute von 0.74 bzw. 0.77 ± 0.04 in H_2O [93-95]. Das Absorptionsspektrum des PS ist in **Abb. 2.2** gezeigt. Das Absorptionsmaximum des Photosensibilisators liegt bei 420 nm (Soret Bande), was dem Emissionsspektrum $\lambda > 400 \text{ nm}$ der Lichtquelle Waldmann PIB 3000 entspricht. Die Q-Bande mit einem weiteren Absorptionspeak liegt bei 532 nm. *TMPyP* ist sehr gut wasserlöslich.

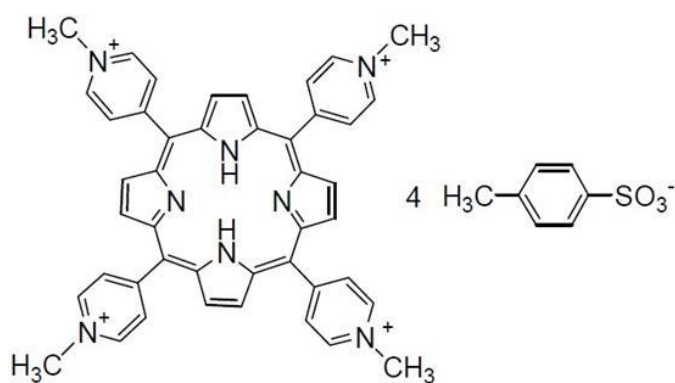


Abb. 2.1: Strukturformel von *TMPyP* mit vier Tosylat-Gegenionen [105]

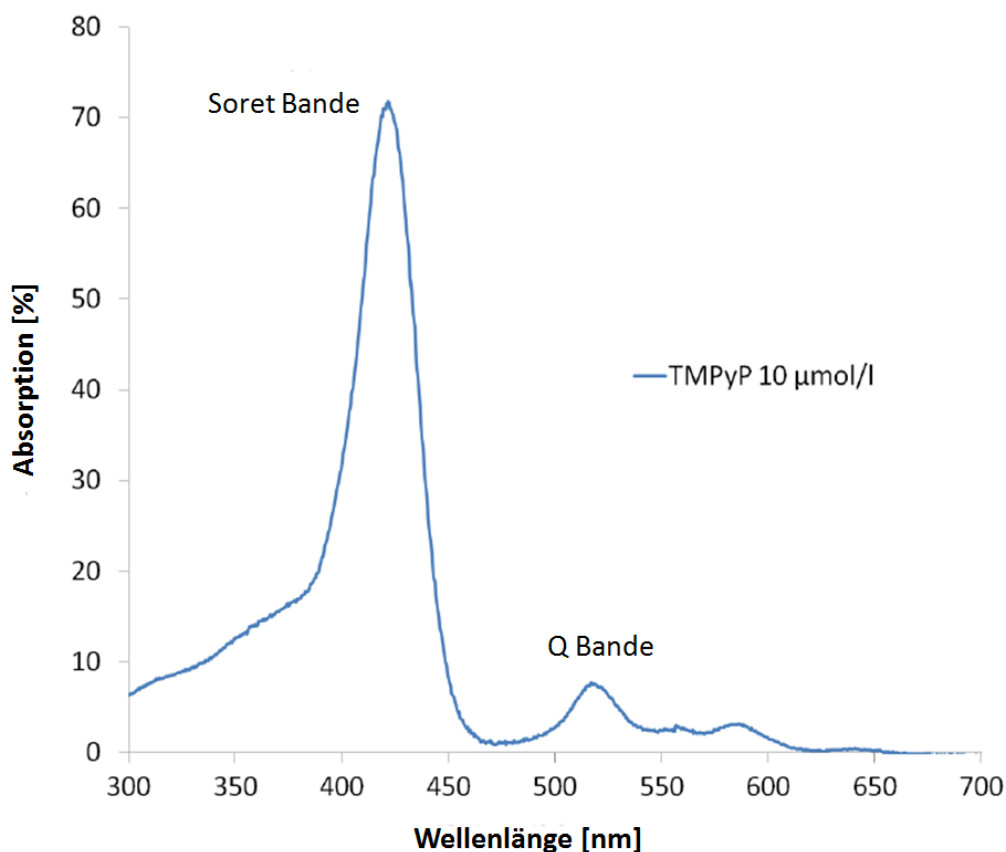


Abb. 2.2: Absorptionsspektrum von TMPyP in H_2O bei einer Konzentration von $10 \mu\text{mol/l}$ [93]

TPyP 8+A

Das Porphyrinderivat 5,10,15,20-tetrakis(N-(3-N,N,N-triethylaminium-propyl)-4-pyridyl)-21H,23H-porphyrin-octachloride, im Folgenden als TPyP 8+A benannt (siehe **Abb. 2.3**), hat eine molare Masse von $MW = 1191.8 \text{ g mol}^{-1}$ ohne Gegenionen und $MW = 1475.4 \text{ g mol}^{-1}$ mit acht Chlorid-Gegenionen. Es wurde von Dr. Andreas Späth in Kooperation mit dem Institut für Organische Chemie unter der Leitung von Prof. König (Universität Regensburg) synthetisiert. Im Rahmen von parallel verlaufenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurden die photophysikalischen Eigenschaften der neuen TMPyP-Derivate von Manuel Kraus untersucht [93]. Es zeigte sich, dass TPyP 8+A eine höhere Photostabilität als TMPyP und mit 0.85 ± 0.05 auch eine höhere Quantenausbeute hat und somit mehr Singulett-Sauerstoff generiert. Das Absorptionsspektrum wird in **Abb. 2.5** mit einem Absorptionsmaximum bei 420 nm gezeigt. Es zeigen sich im Absorptionsspektrum keine Unterschiede im Vergleich mit TMPyP. Im Gegensatz zu TMPyP hat der Farbstoff acht positive Ladungen anstatt vier an den funktionellen Gruppen. Dabei handelt es sich um

Triethylammoniumchloride. Die positive Ladung ist durch die drei Ethylgruppen sterisch abgeschirmt. TPyP 8+A ist ebenfalls in Wasser sehr gut löslich.

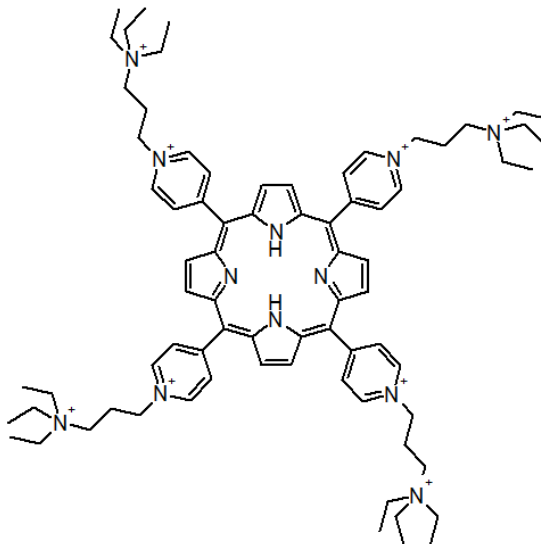


Abb. 2.3: Strukturformel von TPyP 8+A

TPyP 8+B

Das zweite untersuchte Porphyrinderivat 5,10,15,20-tetrakis(N-(3-(N-pyridinium)propyl)-4-pyridyl)-21H,23H-porphyrin-octachloride, kurz TPyP 8+B (siehe **Abb. 2.4**), das ebenfalls in Kooperation mit dem Institut für Organische Chemie an der Universität Regensburg hergestellt wurde, hat eine molare Masse von $MW = 1103.44 \text{ g mol}^{-1}$ ohne Gegenionen und $MW = 1387.04 \text{ g mol}^{-1}$ mit acht Chlorid-Gegenionen. TPyP 8+B zeigt dieselbe Photostabilität wie TMPyP und hat eine Quantenausbeute von 0.83 ± 0.07 [93]. Das Absorptionsspektrum wird in **Abb. 2.5** mit einem Absorptionsmaximum bei 420 nm gezeigt. Hierbei zeigen sich wie bei TPyP 8+A auch keine Veränderungen im Vergleich mit TMPyP. TPyP 8+B hat ebenso acht positive Ladungen an den funktionellen Gruppen, den vier Pyridiniumringen mit je einer positiven Ladung. Dieser Farbstoff zeigt wie die zwei vorherigen Farbstoffe eine gute Löslichkeit in Wasser.

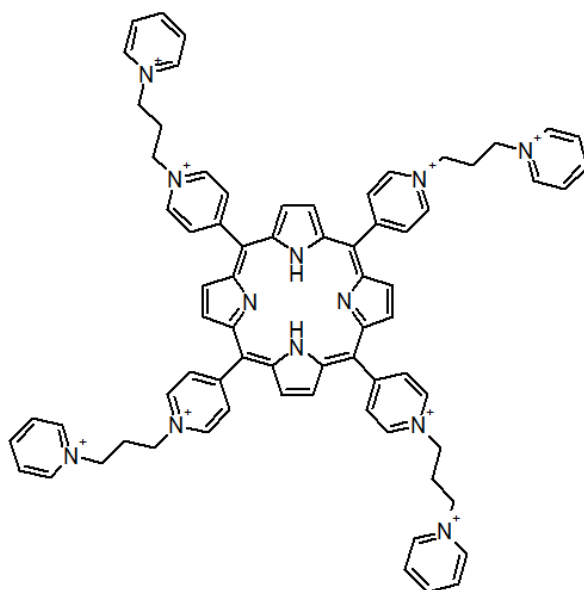


Abb. 2.4: Strukturformel von TPyP 8+B

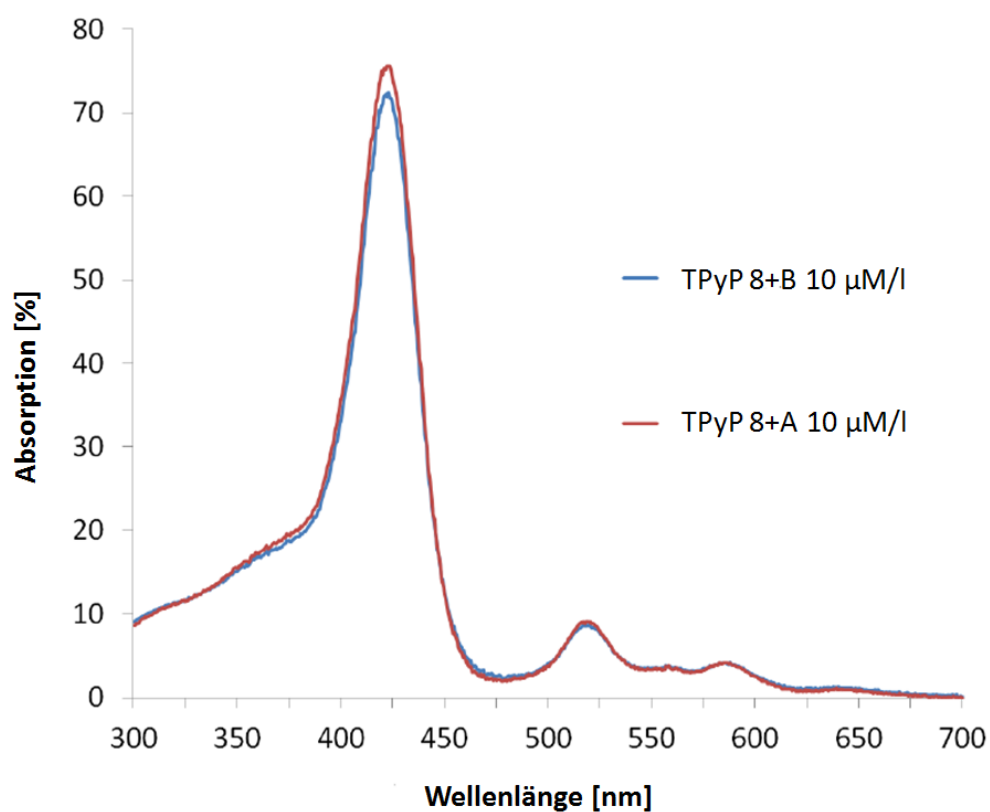


Abb. 2.5: Absorptionsspektren von TPyP 8+A und TPyP 8+B in H₂O bei einer Konzentration von 10 μmol/l [93]

2.2.2 Lösungsmittel

Für alle Experimente wurde H₂O (Millipore Wasser, destilliertes Wasser) als jeweiliges Lösungsmittel verwendet. Für die Phototoxizitätstests mit dem *ex vivo* Schweinehautmodell wurde phosphatgepufferte Salzlösung (PBS; PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) mit einem pH Wert zwischen 7.0 und 7.5 eingesetzt.

2.2.3 Kulturmedien

Müller – Hinton Bouillon und Müller – Hinton Agar

Die Müller – Hinton Bouillon wurde von Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) gekauft. Der Inhalt besteht aus 2.0 g/l Rinderinfusion, 17.5 g/l Casein-Hydrolysat sowie 1.5 g/l Maisstärke. Der Müller – Hinton Agar setzt sich aus den gleichen Zutaten wie die Müller – Hinton Bouillon zusammen; zusätzlich wurden noch 13 g/l Agar hinzugefügt. Der Agar wurde von der Firma Oxoid (Wesel, Deutschland) erstanden und uns freundlicherweise von dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Regensburgs zur Verfügung gestellt.

HEPES – Agar

Der HEPES – Puffer besteht aus 11.9 g HEPES (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), 40 g Natriumchlorid, 1.5 g Kaliumchlorid, 10 g Glukose, jeweils von Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), sowie 450 ml destilliertem Wasser; pH Wert 7.55. Für den HEPES – Agar wurden 16.68 ml des HEPES – Puffers zu 150 ml Agar hinzugefügt. Der verwendete Agar im HEPES – Agar besteht aus 1.5 g Agar (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und 150 ml destilliertem Wasser.

2.3 LICHTQUELLE und TECHNISCHES EQUIPMENT

2.3.1 Waldmann PIB 3000 (Vollspektrum > 400 nm)

Die Bakteriensuspensionen wurden mit der inkohärenten Lichtquelle PIB 3000 (Breitbandlampe; spektrale Strahlungsverteilung: Emission $\lambda > 400$ nm, ein Prototyp, von der Firma Waldmann Medizintechnik zur Verfügung gestellt) bestrahlt. Die maximale Lichtintensität war $P = 50 \text{ mW cm}^{-2}$ auf dem Niveau der bestrahlten Proben mit dem gesamten Lampenspektrum bei Wellenlängen > 400 nm. Die applizierten Lichtdosen wurden über Multiplikation der emittierten Leistung P der Lichtquelle und der Bestrahlungszeit t berechnet, wobei $E(t)$ für die Verweilzeit und A für den Flächeninhalt steht.

$$\text{Lichtdosis} = \frac{E(t)}{A} = \frac{P \cdot t}{A}$$

Bei einer Bestrahlungszeit von 10 s entspricht dies 0.5 J cm^{-2} . Das Emissionsspektrum der Lichtquelle wurde von der Firma Waldmann bereitgestellt, siehe **Abb. 2.6**.

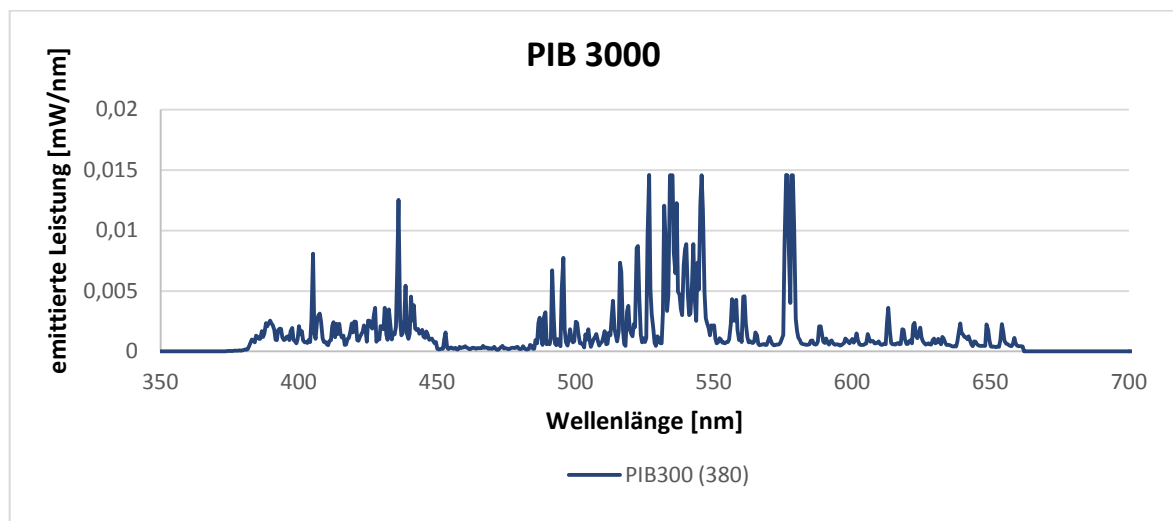


Abb. 2.6: Emissionsspektrum der inkohärenten Lichtquelle Waldmann PIB 3000

2.3.2 Geräte

Zentrifuge

Megafuge 1.0 der Firma Heraeus Sepaech (Hanau, Deutschland)

Zentrifuge 5415 R der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Spektrophotometer

DU® 640 von Beckman (Fullerton, USA)

Waage

Sartorius CP 255D von Sartorius (Göttingen, Deutschland)

Sterile Werkbank

Laminaflow Hera safe von Kendro Laboratory Products (Hanau, Deutschland)

Langhaarschneider

Moser ProfiLine Genio titan Professional cord/cordless Langhaarschneider Typ 1565 (Unterkirnach, Deutschland)

2.4 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN

2.4.1 Bakterienstämme

Um ein möglichst großes Spektrum an Bakterien zu testen, wurden vier unterschiedliche Mikroorganismen für die Untersuchung der phototoxischen Effektivität des jeweiligen PS in Lösung verwendet. Der Gram-positive *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) und der Gram-negative *Escherichia coli* (ATCC 25922) wurden als Beispiele für Antibiotika-sensible Mikroorganismen ausgewählt. Um die Effektivität der PS an multiresistenten Mikroorganismen zu testen, wurde ein MRSA-Stamm (Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*, ATCC BAA-44) als Beispiel für multiresistente Gram-positive Bakterien sowie ein klinisches Isolat eines Ciprofloxacin-resistenten *Escherichia coli* (CIP, Resistenzprofil: siehe Anhang 9.1, Tabelle 9.1) als Beispiel für multiresistente Gram-negative Bakterien untersucht. Für die Phototoxizitätstests mit dem *ex vivo* Schweinehautmodell wurden *S. aureus* sowie *E. coli* verwendet.

2.4.2 Kulturbedingungen

Vor den *in vitro* Experimenten mit und ohne Waschen sowie vor den *ex vivo* Experimenten wurden alle untersuchten Bakterien gleichermaßen kultiviert: Die Bakterienstämme *S. aureus* und *E. coli* sowie MRSA und CIP wurden jeweils aerob bei 37 °C über Nacht in 5 ml Müller – Hinton Bouillon inkubiert. Sobald die Kulturen die stationäre Phase des Wachstums erreichten, wurden die Bakteriensuspensionen bei 3000 rpm für 10 min zentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus Sepaech, Hanau, Deutschland) und in H₂O suspendiert. Im Folgenden wurden die Bakterienlösungen auf eine optische Dichte von OD = 0.6 mit Hilfe eines Spektrophotometers (DU® 640 von Beckman, Fullerton, USA) bei 600 nm eingestellt, was ca. 10⁸ – 10⁹ Kolonie – bildenden Einheiten (*Colony Forming Units*, CFU) ml⁻¹ entspricht. Ein Volumen von entweder 50 µl oder 300 µl (dies war abhängig vom nachfolgenden Versuchsaufbau) der Bakteriensuspensionen wurde für entweder 30 s, 10 min oder 60 min im Dunkeln mit 50 µl oder 300 µl der gewünschten Konzentration des jeweiligen PS inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Bakterien für 10 s mit der inkohärenten Lichtquelle Waldmann PIB 3000 bestrahlt.

Zur Kontrolle wurden eine Licht- und eine Dunkelkontrolle angefertigt: Bei der Lichtkontrolle wurde zu der Bakteriensuspension statt des Farbstoffs destilliertes Wasser hinzugefügt und anschließend bestrahlt. Bei der Dunkelkontrolle wurde der PS mit den Bakterien suspendiert, jedoch ohne hinterher bestrahlt zu werden. In der **Tabelle 2.1** sind alle möglichen Inkubationsbedingungen zusammengefasst aufgeführt, wobei **mit Licht** die bestrahlten Proben bezeichnet und **ohne Licht** die Dunkelkontrollen. Die Konstellation - PS + L steht für die Lichtkontrolle, da anstatt des Photosensibilisators destilliertes Wasser zur Bakteriensuspension hinzugefügt und anschließend bestrahlt wurde. Die Dunkelkontrollen werden durch die Konstellationen + PS - L sowie - PS - L dargestellt. Es wurde einerseits die höchste Konzentration des Photosensibilisators zur Bakteriensuspension hinzugefügt, jedoch ohne anschließende Bestrahlung und andererseits wurde analog zur Lichtkontrolle destilliertes Wasser zur Bakteriensuspension hinzugefügt, ebenfalls ohne anschließende Bestrahlung.

Tab. 2.1: Inkubationsbedingungen mit Licht- und Dunkelkontrollen

	Mit Licht (+L)	Ohne Licht (-L)
Mit Photosensibilisator (+PS)	+PS + L	+PS -L
Ohne Photosensibilisator (-PS)	- PS + L	- PS - L

2.4.3 Phototoxizitätstests *in vitro*

In vitro Experimente ohne Waschen

50 µl einer Bakteriensuspension mit einer OD = 0.6 wurden für 30 s, 10 min oder 60 min mit 50 µl des Photosensibilisators mit jeweils unterschiedlichen Konzentrationen (0 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM, 5 µM, 10 µM sowie 50 µM) im Dunkeln inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Bakterien in eine 96-Well Platte transferiert und für 10 s mit der inkohärenten Lichtquelle Waldmann PIB 3000 (Emission $\lambda > 400$ nm) mit einer Leistung von $P = 50 \text{ mW cm}^{-2}$ bestrahlt. Die Leistung wurde vor der Bestrahlung mit Hilfe eines Sensors eingestellt, welcher von der Firma Waldmann bereitgestellt wurde. Die Kontrollen wurden entweder ohne nachfolgende Bestrahlung mit einem Photosensibilisator inkubiert (Dunkelkontrolle) oder sie wurden ohne vorherige Inkubation mit dem Photosensibilisator bestrahlt (Lichtkontrolle). Nach der Bestrahlung wurde eine serielle 10-fach Verdünnungsreihe (10^{-2} bis 10^{-7}) in Müller – Hinton Bouillon hergestellt und Aliquots (je 3

× 20 µl) auf Müller – Hinton Agar ausplattiert. Die Anzahl der CFU ml⁻¹ wurde nach Inkubation über Nacht bei 37°C nach der Methode von Miles, Misra und Irwin bestimmt [106].

In vitro Experimente mit Waschen

300 µl der Bakteriensuspension mit einer optischen Dichte von OD = 0.6 wurden mit 300 µl der jeweiligen Konzentration des PS behandelt (0 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM, 5 µM, 10 µM sowie 50 µM) und in 1.5 ml Eppendorf Mikroreaktionsgefäßen für 10 min im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Reaktionsgefäße bei 13 000 rpm für 10 min zentrifugiert (Zentrifuge 5415 R, Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Anschließend wurde das Präzipitat in 600 µl Millipore Wasser aufgelöst. Diese Waschprozedur wurde einmal wiederholt. 100 µl der Suspension wurden anschließend in eine 96-Well Platte gegeben und für 10 s bestrahlt. Aliquots (20 µl) aus der seriellen Verdünnungsreihe (10⁻² bis 10⁻⁷) der behandelten Bakterien sowie aus den Licht- und Dunkelkontrollen, wurden auf Müller – Hinton Agar Platten ausplattiert und die CFU ml⁻¹ nach Inkubation über Nacht bei 37 °C ausgezählt.

2.4.4 Phototoxizitätstests *ex vivo* Schweinehautmodell

Vorbereitung der Schweinehaut:

Eine Vollhautprobe (ca. 10 cm × 15 cm) von 6 Monate alten Schweinen (Kreuzzüchtung Pietrain mit Deutscher Landrasse) ohne weitere Vorbearbeitung wurde direkt nach der Schlachtung von einer lokalen Metzgerei bezogen (Metzgerei Stierstorfer, Wenzenbach, Deutschland). Die Schweineborsten wurden mit einem Langhaarschneider (siehe Geräte Kapitel 2.3.2) rasiert und das subkutane Fettgewebe mit einem Skalpell entfernt. Die Oberfläche der Schweinehaut wurde mit einer 70 % Alkohollösung desinfiziert, um die Inaktivierung der lokalen Flora sicherzustellen. Die Haut wurde in kleine Stücke von jeweils ca. 3 cm × 3 cm geschnitten, in Petri – Schalen gelegt und in HEPES – Agar eingebettet (siehe **Abb. 2.7 – 2.12**). Das Stratum corneum lag frei und hatte somit Luftkontakt.

Phototoxizitätstests:

50 µl der Bakteriensuspension mit einer optischen Dichte von OD = 0.6 wurden auf die Oberfläche der Hautstücke getropft und auf die sterile Werkbank unter den Laminarflow

gestellt, bis die Tropfen optisch getrocknet waren (siehe **Abb. 2.13**). Die Schweinehaut wurde für 30 min mit 0 μM , 1 μM , 5 μM und 50 μM des jeweiligen Photosensibilisators inkubiert und für 30 min mit einer maximalen Lichtintensität von $P = 50 \text{ mW cm}^{-2}$ bestrahlt. Die Kontrollen wurden entsprechend wie bei den *in vitro* Suspensionsversuchen durchgeführt, indem entweder der PS mit den Bakterien ohne nachfolgende Bestrahlung als Dunkelkontrolle inkubiert wurde oder eine Bakteriensuspension ohne PS als Lichtkontrolle bestrahlt wurde.

Nach der Bestrahlung wurden die Bakterien von der Schweinehaut mit einem sterilen Wattebausch abgetragen und in 1 ml Müller – Hinton Bouillon getaucht (siehe **Abb. 2.14**). Es wurde eine serielle Verdünnungsreihe (10^{-2} bis 10^{-7}) in Müller – Hinton Bouillon hergestellt und die Bakterien nach Miles, Misra und Irwin ausplattiert [106]. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden die Kolonie – bildenden Einheiten (CFU: *colony forming units*) gezählt.



Abb. 2.7: Schweinehaut mit Borsten



Abb. 2.8: Schweinehaut nach Rasur



Abb. 2.9: Unterseite des Hautstücks – Unterhautfettgewebe **Abb. 2.10:** Halb entferntes Unterhautfettgewebe rechts



Abb. 2.11: *Komplett entferntes Unterhautfettgewebe*

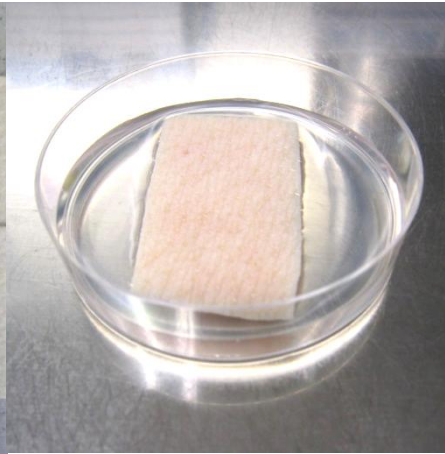


Abb. 2.12: *Haut eingebettet in HEPES – Agar, Stratum corneum liegt frei mit Luftkontakt*

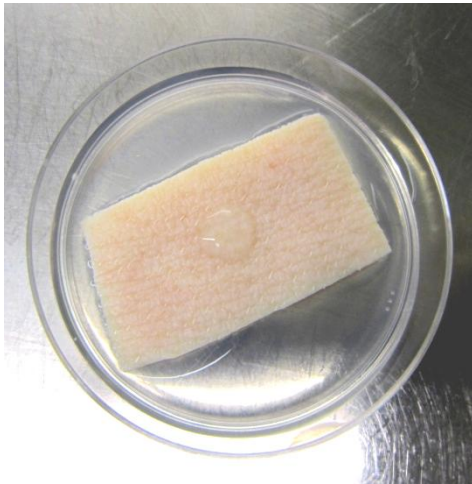


Abb. 2.13: *Bakterientropfen auf der Haut*

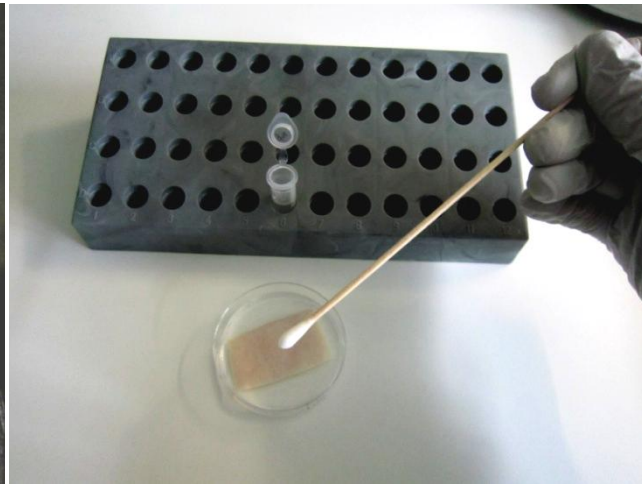


Abb. 2.14: *Überführung der Bakterien ins Reaktionsgefäß*

2.5 DATENAUSWERTUNG

Zur Datenauswertung wurde mit Microsoft Office Excel 2007 ein Mittelwert aus der Anzahl aller Experimente mit Standardabweichungen ermittelt. Jedes Experiment wurde dreimal durchgeführt.

Für jedes Experiment wurden verschiedene Konzentrationen der drei Farbstoffe verwendet. Die Konzentrationen (0 μM bis 50 μM) werden in den dargestellten Abbildungen im folgenden Kapitel auf der x-Achse der Graphen in den Abbildungen gezeigt. Auf der y-Achse sind die CFU ml^{-1} im Zehnerlogarithmus angegeben. Bei 0 μM sind die Lichtkontrollen (bestrahlte Bakterien ohne Farbstoff) sowie die Dunkelkontrollen mit 0 μM (Bakterien ohne Farbstoff sowie ohne Bestrahlung) dargestellt. Jeder Keim mit Bestrahlung (in der Legende als „Keim + Licht“) und ohne Bestrahlung (in der Legende als „Keim - Licht“ festgelegt) wurde in der Legende mit je einer Farbe kodiert. Bei 50 μM stehen einerseits die bestrahlten Keime, die mit 50 μM des PS inkubiert wurden sowie die nicht-bestrahlten Dunkelkontrollen, welche ebenfalls mit 50 μM inkubiert wurden.

In den Tabellen werden die für eine desinfizierende Wirkung benötigten Konzentrationen des PS bei den unterschiedlichen Inkubationszeiten mit der erzielten maximal erreichten Keimreduktion des jeweiligen Bakteriums gezeigt.

3 ERGEBNISSE

Die Photosensibilisatoren TPyP 8+A sowie TPyP 8+B wurden hinsichtlich ihrer phototoxischen Eigenschaften mit dem Referenzfarbstoff TMPyP verglichen. In **Tabelle 3.1** sind photophysikalische Eigenschaften der drei untersuchten Photosensibilisatoren dargestellt. Die Quantenausbeute bezüglich Singulett-Sauerstoff wurde in Kooperation im Rahmen der Masterarbeit von Manuel Kraus durchgeführt [93].

Tab. 3.1: Photophysikalische Eigenschaften von TMPyP, TPyP 8+A sowie TPyP 8+B

Eigenschaft	1) TMPyP	2) TPyP 8+A	3) TPyP 8+B
Molare Masse	684.77 g mol ⁻¹	1191.8 g mol ⁻¹	1103.44 g mol ⁻¹
ohne/mit Gegenionen	1363.63 g mol ⁻¹	1475.4 g mol ⁻¹	1387.04 g mol ⁻¹
Quantenausbeute	0.77 ± 0.04	0.85 ± 0.05	0.83 ± 0.07
Ladung	4 positive Ladungen	8 positive Ladungen	8 positive Ladungen
Absorptionsmaxima	420 nm und 532 nm	420 nm und 532 nm	420 nm und 532 nm
Photostabilität*	0 %/32 %	0 %/21 %	0 %/32 %
*Absorptionsabnahme in % nach 2 min/25 min Bestrahlung mit dem Laser [135 mW 1)/141 mW 2)+3)]			
Lipophilie	gering	gering	gering
Wasserlöslichkeit	sehr gut	sehr gut	sehr gut

3.1 PHOTOTOXIZITÄTSTESTS *IN VITRO*

3.1.1 TMPyP

Bei den Phototoxizitätstests *in vitro* mit TMPyP wurden die vier untersuchten Bakterienstämme *E. coli*, *S. aureus*, MRSA sowie CIP jeweils für 30 s, 10 min oder 60 min mit unterschiedlichen Konzentrationen des Photosensibilisators inkubiert. *E. coli* und *S. aureus* wurden mit 0.5 μM , 1 μM , 2.5 μM , 5 μM , 10 μM sowie 50 μM inkubiert. CIP und MRSA wurden mit 5 μM sowie 50 μM des PS bei einer Inkubationszeit (IZ) von 30 s inkubiert. Bei einer Inkubationszeit von 10 min und 60 min wurden die beiden letzteren Keime mit 2.5 μM und 50 μM TMPyP inkubiert. Anschließend wurden die Suspensionen aus PS und Bakterien für 10 s mit der inkohärenten Lichtquelle Waldmann PIB 3000 (Emission $\lambda > 400 \text{ nm}$) bestrahlt. In Anlehnung an Boyce *et al.* und der allgemeinen Definition für Antisepsis wurde eine antimikrobielle Wirkung ab einer Keimreduktion von 99.999 % angenommen, was fünf \log_{10} -Stufen entspricht [104, 107].

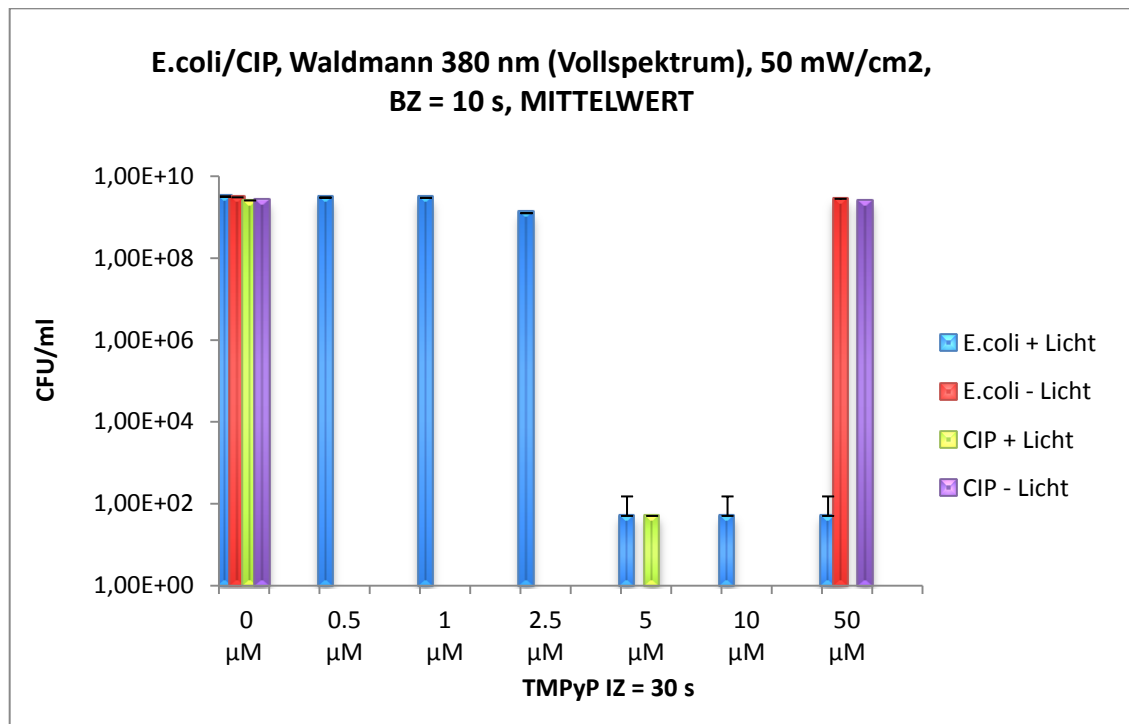
Nach einer Inkubationszeit von 30 s wurde nach Bestrahlung bei einer Konzentration von 5 μM TMPyP bei allen vier Bakterienstämmen eine desinfizierende Wirkung erzielt, da sich eine Keimreduktion von über sieben \log_{10} -Stufen (99,99999 %) zeigte (7.7 – 7.8 \log_{10} -Stufen), siehe **Abb. 3.1** und **3.2**. Eine weitere Erhöhung der Konzentration führte zu keiner Verbesserung des antibakteriellen Effekts. In den **Abbildungen 3.1** und **3.2** werden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Keimreduktion der Bakterien mit den getesteten Konzentrationen von TMPyP bei den vier untersuchten Stämmen (IZ = 30 s) mitsamt den Dunkelkontrollen dargestellt. Aus Übersichtsgründen erfolgt die grafische Darstellung der Ergebnisse nur beispielhaft für die Inkubationszeit von 30 s für jeden untersuchten Photosensibilisator. Eine komplette Darstellung aller Abbildungen der Phototoxizitätstests *in vitro* ohne Waschen befindet sich im Anhang (siehe **Kapitel 9.2**).

Bei Inkubationszeiten von 10 min bzw. 60 min zeigte sich ebenfalls ein antibakterieller Effekt von einer Keimreduktion um jeweils 6.3 – 7.7 \log_{10} -Stufen nach Bestrahlung, allerdings schon bei einer Konzentration von 2.5 μM (siehe **Abb. 9.3 – 9.6** im **Kapitel 9.2**). Zusätzlich konnte bei *E. coli* mit einer IZ von 60 min beobachtet werden, dass bei einer Konzentration von 1 μM bereits eine Keimreduktion von 4.1 \log_{10} -Stufen erreicht werden konnte. Bei *S. aureus* wurde mit 1 μM keine Keimreduktion erzielt. Eine Übersicht der benötigten Farbstoffkonzentrationen für eine desinfizierende Wirkung mit der jeweils erzielten Keimreduktion in \log_{10} -Stufen nach Belichtung wird in der **Tabelle 3.2** dargestellt.

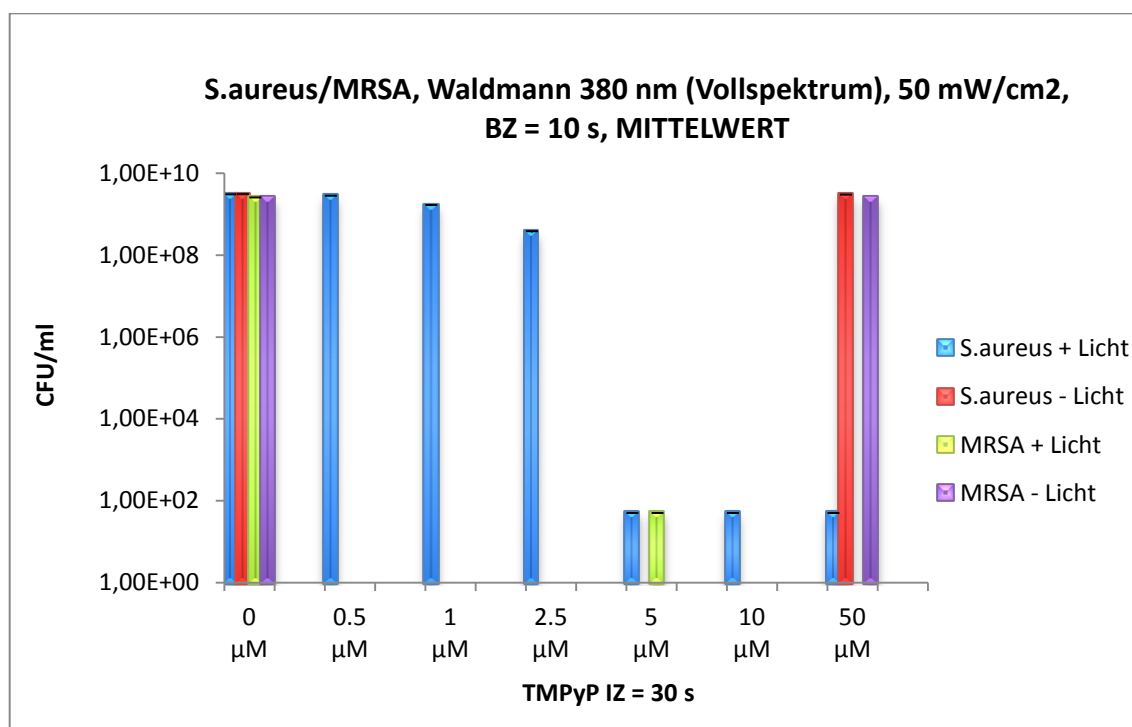
Die Experimente der Keime CIP und MRSA wurden nach den Versuchen mit *E. coli* und *S. aureus* durchgeführt. Die untersuchten Konzentrationen des PS konnten dadurch für die Experimente mit CIP und MRSA basierend auf den zuvor gewonnen Ergebnissen mit *E. coli* und *S. aureus* reduziert werden. Da sich mit letzteren Keimen bei einer IZ von 30 s ab 5 μM des PS TMPyP eine Keimreduktion mit antimikrobieller Wirkung nach Lichtaktivierung zeigte, wurden die untersuchten Konzentrationen des PS mit CIP und MRSA bei dieser IZ (30 s) auf 5 μM und 50 μM reduziert. Bei den Inkubationszeiten von 10 min und 60 min zeigte sich mit einer Konzentration von 2.5 μM des PS eine antimikrobielle Wirkung nach Lichtaktivierung, woraufhin die untersuchten Konzentrationen des PS mit CIP und MRSA bei 10 min bzw. 60 min auf 2.5 μM sowie 50 μM reduziert wurden.

Für die Kontrollen wurden die Bakterien aller vier Stämme mit jeweils 0 μM bzw. 50 μM der PS als positive Lichtkontrolle (bestrahlt, ohne PS) und als negative Dunkelkontrolle (nicht bestrahlt, mit PS) inkubiert. Die Kontrollen zeigen, dass eine Abtötung der Bakterien nur durch die Kombination aus der Inkubation mit dem PS sowie der Bestrahlung mit Licht aus dem sichtbaren Wellenlängenbereich erfolgte. Die Lichtkontrolle zeigte, dass bei reiner Bestrahlung ohne PS keine Keimreduktion stattfand, beispielsweise durch thermische Schäden. Umgekehrt wurden bei der Dunkelkontrolle, das heißt bei der Inkubation mit dem PS (max. 50 μM) ohne nachfolgende Bestrahlung zunächst bei *E. coli* eine Dunkeltoxizität beobachtet, in einem zweiten Schritt im Rahmen von Versuchswiederholungen wurden jedoch keine Bakterien abgetötet (siehe **Kapitel 3.1.4**).

Abb. 3.1: TMPyP mit *E. coli* und CIP, IZ = 30 s, Bestrahlungszeit (BZ) = 10 s



Es werden die Mittelwerte der erzielten Keimreduktionen für je zwei Keime und einen PS je Abbildung dargestellt. Auf der x-Achse sind die Konzentrationen des PS dargestellt; auf der y-Achse die CFU ml⁻¹ im Zehnerlogarithmus. Die Standardabweichungen sind als schwarze vertikale Balken bei den jeweiligen Mittelwerten eingezeichnet. BZ: Bestrahlungszeit in Sekunden, IZ: Inkubationszeit in Sekunden. *E. coli* steht für *Escherichia coli*, CIP steht für den Ciprofloxacin resistenten *Escherichia coli*.

Abb. 3.2: TMPyP mit *S. aureus* und MRSA, IZ = 30 s, BZ = 10 s**Tab. 3.2:** Erreichte Keimreduktion mit TMPyP

IZ; Konzentration	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA	CIP
30 s; 5 µM	7.8 log ₁₀	7.8 log ₁₀	7.7 log ₁₀	7.7 log ₁₀
10 min; 2.5 µM	7.7 log ₁₀	6.3 log ₁₀	7.7 log ₁₀	7.7 log ₁₀
60 min; 2.5 µM	6.4 log ₁₀	7.7 log ₁₀	7.7 log ₁₀	7.7 log ₁₀

Benötigte Farbstoffkonzentrationen für eine desinfizierende Wirkung (>5 log₁₀-Stufen) mit der jeweils erzielten Keimreduktion in log₁₀-Stufen; IZ: Inkubationszeit

3.1.2 TPyP 8+A

Bei den Phototoxizitätstests mit TPyP 8+A wurden die vier untersuchten Bakterienstämme ebenso wie bei TMPyP für 30 s, 10 min und 60 min mit dem PS inkubiert. *E. coli* und *S. aureus* wurden wie bei TMPyP mit 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM, 5 µM, 10 µM sowie 50 µM inkubiert; MRSA und CIP jedoch abweichend von TMPyP mit 0 µM und 2.5 µM des PS bei allen drei Inkubationszeiten. Es hatte sich bei den vorangegangenen Versuchen mit *E. coli* und *S. aureus* gezeigt, dass bei einer IZ von 30 s bereits mit 2.5 µM des PS TPyP 8+A eine Keimreduktion mit antimikrobieller Wirkung erzielt werden konnte, weswegen die

Konzentrationen für die Keime CIP und MRSA dementsprechend mit 2.5 μM behandelt wurden.

Im Anschluss wurden die Bakteriensuspensionen für 10 s bestrahlt. Die Konzentrationen für die Dunkel- und Lichtkontrollen entsprechen den Konzentrationen bei TMPyP (für die Lichtkontrollen 0 μM und die Dunkelkontrollen jeweils 0 μM und 50 μM bei allen vier untersuchten Bakterienstämmen). In den **Abbildungen 3.3** und **3.4** sind beispielhaft die Mittelwerte und Standardabweichungen der Keimreduktion der Bakterien mit den getesteten Konzentrationen für TPyP 8+A bei den vier untersuchten Stämmen mitsamt den Dunkelkontrollen bei einer Inkubationszeit von 30 s dargestellt. Es konnte bereits bei 2.5 μM bei einer Inkubationszeit von 30 s nach Lichtaktivierung mit allen vier Stämmen eine desinfizierende Wirkung erreicht werden (Reduktion um 6.9 – 7.7 \log_{10} -Stufen). Mit *E. coli* zeigte sich zusätzlich bei dieser IZ bei 1 μM eine Keimreduktion von 4.3 \log_{10} -Stufen (siehe **Abb. 3.3** und **3.4**).

Bei einer IZ von 10 min konnte ebenfalls bei 2.5 μM nach Bestrahlung für alle vier Stämme eine Reduktion der Keime entsprechend einer antimikrobiellen Wirkung erreicht werden (siehe **Abb. 9.9** und **9.10, Kapitel 9.2**). Mit einer Konzentration von 1 μM konnte bei derselben IZ bei *E. coli* eine Reduktion von über 5 \log_{10} -Stufen erreicht werden (siehe **Abb. 9.9**).

Bei einer IZ von 60 min konnten auch hier alle vier Keimstämme mit einer Konzentration des PS von 2.5 μM um über 5 \log_{10} -Stufen reduziert werden (siehe **Abb. 9.11** und **9.12, Kapitel 9.2**). Mit 0.5 μM konnte *E. coli* bei dieser IZ um 4.4 \log_{10} -Stufen reduziert werden; mit 1 μM um 6.6 \log_{10} -Stufen, jeweils nach Bestrahlung. Dies entspricht einer desinfizierenden Wirkung (siehe **Abb. 9.11**).

S. aureus zeigte bei keiner IZ eine Keimreduktion mit 0.5 sowie 1 μM nach Lichtaktivierung (siehe **Abb. 3.4**, sowie **9.10** und **9.12, Kapitel 9.2**). Die Ergebnisse zur antibakteriellen Wirkung von TPyP 8+A nach Belichtung sind zusammengefasst in der **Tabelle 3.3** dargestellt.

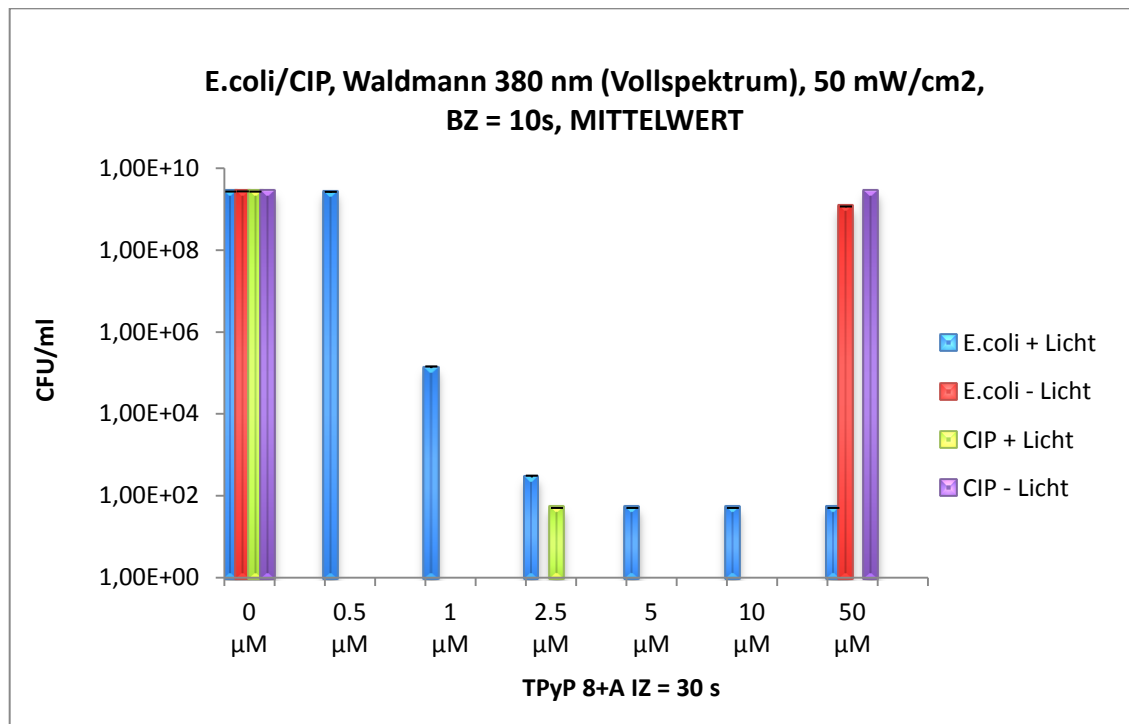
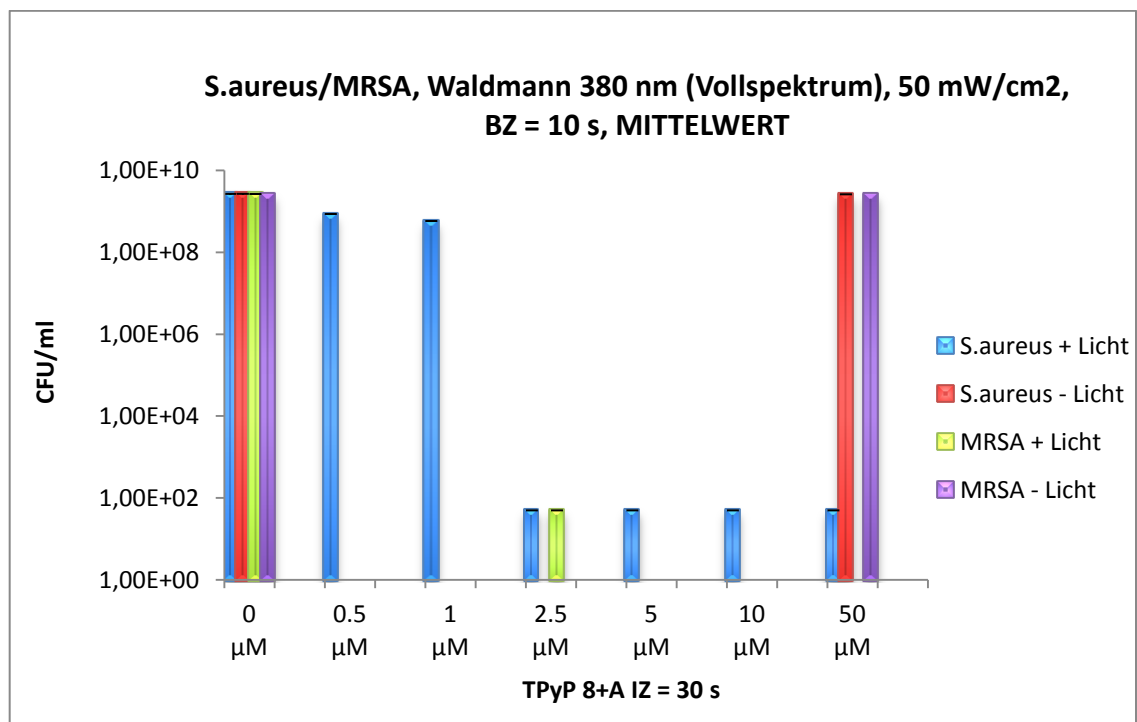
Abb. 3.3: TPyP 8+A mit *E. coli* und CIP, IZ = 30 s, BZ = 10 s**Abb. 3.4:** TPyP 8+A mit *S. aureus* und MRSA, IZ = 30 s, BZ = 10 s

Abb. 3.3 und 3.4: X-Achse: Konzentrationen des PS. Y-Achse: CFU ml⁻¹ im Zehnerlogarithmus. BZ: Bestrahlungszeit in Sekunden, IZ: Inkubationszeit in Sekunden. *E. coli*: Escherichia coli, CIP: Ciprofloxacin resistenten Escherichia coli. *S. aureus*: Staphylococcus aureus, MRSA: Methicillin-resistenter *S. aureus*.

Tab. 3.3: Keimreduktion mit TPyP 8+A nach Lichtaktivierung

IZ; Konzentration	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA	CIP
30 s; 2.5 µM	6.9 log ₁₀	7.7 log ₁₀	7.7 log ₁₀	7.7 log ₁₀
10 min; 2.5 µM	7.7 log ₁₀	7.7 log ₁₀	7.7 log ₁₀	7.7 log ₁₀
60 min; 2.5 µM	7.7 log ₁₀	7.7 log ₁₀	7.7 log ₁₀	7.7 log ₁₀

Benötigte Farbstoffkonzentrationen für eine desinfizierende Wirkung (>5 log₁₀-Stufen) mit der jeweils erzielten Keimreduktion in log₁₀-Stufen; IZ: Inkubationszeit

3.1.3 TPyP 8+B

TPyP 8+B wurde mit allen Bakterienstämmen entsprechend wie TPyP 8+A untersucht, es konnte wie bei TPyP 8+A bereits bei 2.5 µM bei einer Inkubationszeit von 30 s mit allen vier Stämmen nach Bestrahlung eine desinfizierende Wirkung erreicht werden (Reduktion um 6.2 – 7.7 log₁₀-Stufen). Die Ergebnisse nach einer Inkubationszeit von 30 s (Mittelwerte sowie Standardabweichungen und Licht- mit Dunkelkontrollen) sind in den **Abbildungen 3.5** sowie **3.6** dargestellt.

Bei einer Inkubationszeit von 10 min konnte ebenfalls mit allen vier Bakterienstämmen und einer Konzentration von 2.5 µM nach Lichtaktivierung ein antimikrobieller Effekt erzielt werden (siehe **Abb. 9.15** und **9.16, Kapitel 9.2**). Zudem konnte bei 10 min mit 1 µM bereits eine Reduktion von 4.7 log₁₀-Stufen für *E. coli* nach Belichtung erzielt werden (siehe **Abb. 9.15**).

Bei einer IZ von 60 min wurde mit 2.5 µM auch eine Keimreduktion über 5 log₁₀-Stufen nach Bestrahlung für alle Bakterienstämme erzielt (siehe **Abb. 9.17** und **9.18, Kapitel 9.2**); mit 1 µM konnte zudem eine Reduktion von 5.5 log₁₀-Stufen für *E. coli* nach Belichtung erzielt werden (siehe **Abb. 9.17**). Die Ergebnisse zur photodynamischen antibakteriellen Wirkung von TPyP 8+B nach Belichtung sind zusammengefasst in der **Tabelle 3.4** dargestellt.

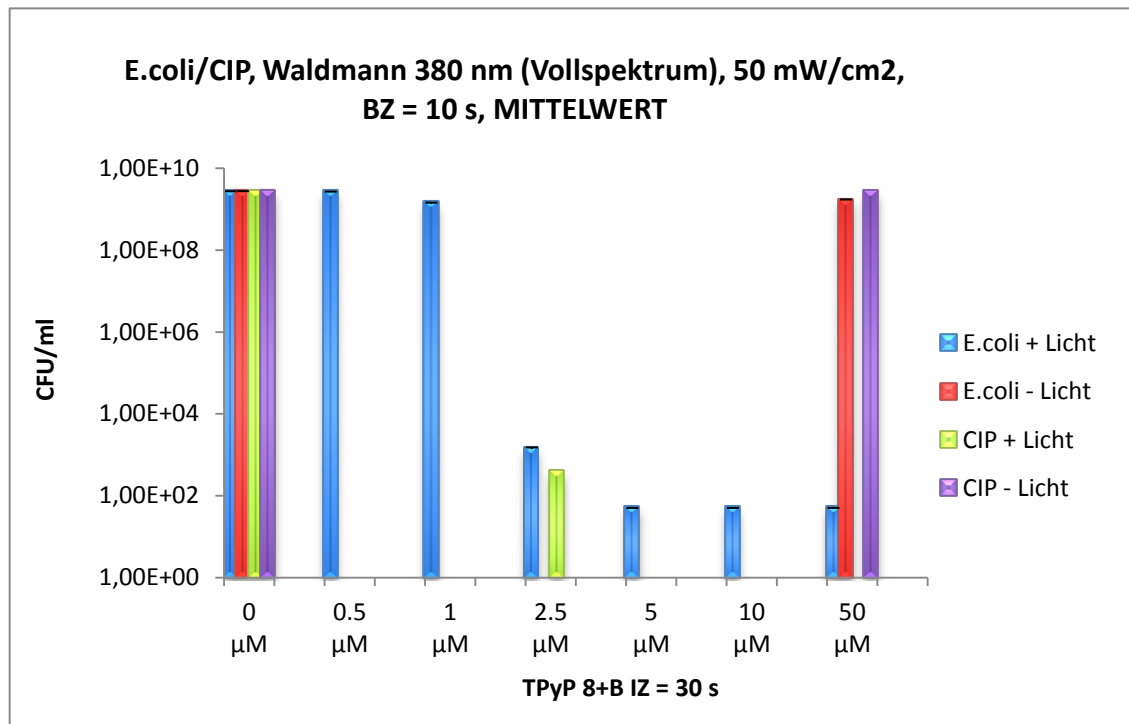
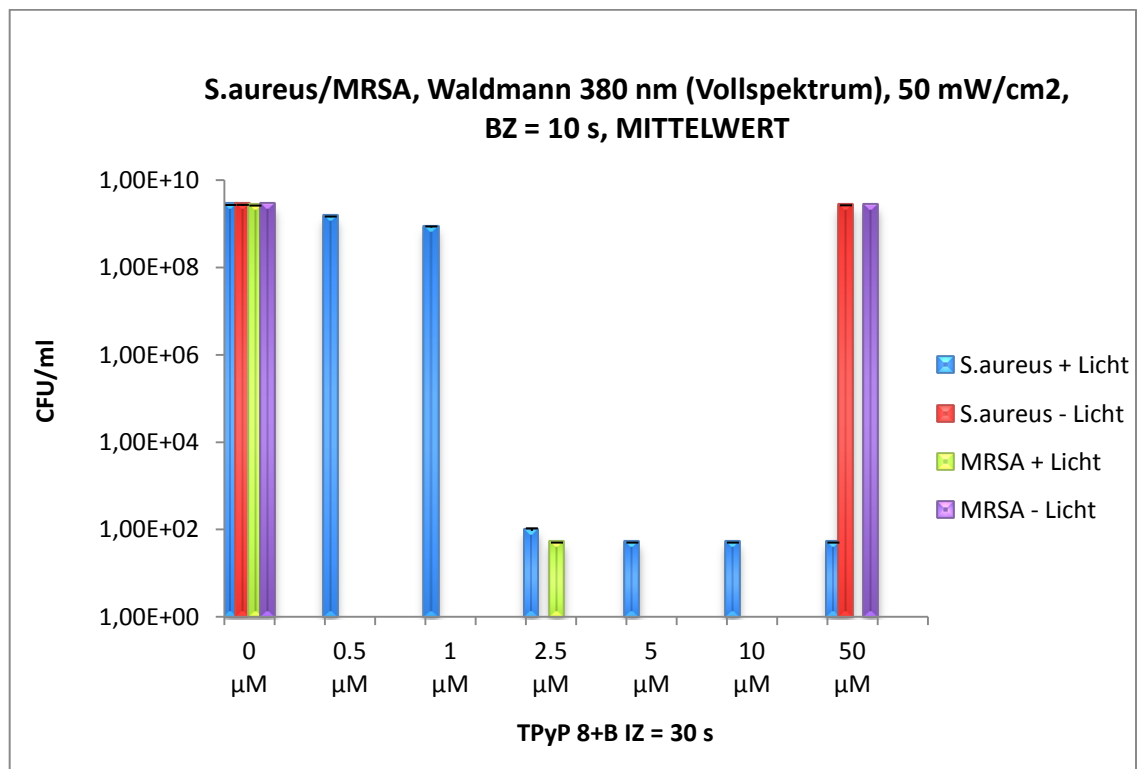
Abb. 3.5: TPyP 8+B mit *E. coli* und CIP, IZ = 30 s, BZ = 10 s**Abb. 3.6:** TPyP 8+B mit *S. aureus* und MRSA, IZ = 30 s, BZ = 10 s

Abb. 3.5 und 3.6: X-Achse: Konzentrationen des PS. Y-Achse: CFU ml⁻¹ im Zehnerlogarithmus. BZ: Bestrahlungszeit in Sekunden, IZ: Inkubationszeit in Sekunden. *E. coli*: Escherichia coli, CIP: Ciprofloxacin resistenten Escherichia coli. *S. aureus*: Staphylococcus aureus, MRSA: Methicillin-resistenter *S. aureus*.

Tab. 3.4: Keimreduktion mit TPyP 8+B nach Lichtaktivierung

IZ; Konzentration	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA	CIP
30 s; 2.5 μM	6.2 log ₁₀	7.5 log ₁₀	7.7 log ₁₀	6.8 log ₁₀
10 min; 2.5 μM	7.3 log ₁₀	7.6 log ₁₀	7.7 log ₁₀	7.7 log ₁₀
60 min; 2.5 μM	7.7 log ₁₀	7.7 log ₁₀	7.7 log ₁₀	7.7 log ₁₀

Benötigte Farbstoffkonzentrationen für eine desinfizierende Wirkung (>5 log₁₀-Stufen) mit der jeweils erzielten Keimreduktion in log₁₀-Stufen; IZ: Inkubationszeit

3.1.4 Dunkeltoxizität

Mit allen drei Photosensibilisatoren wurde bei einer IZ von 60 min eine Dunkeltoxizität in Form von einer Keimreduktion um 4.4 log₁₀-Stufen (TMPyP), 5.2 log₁₀-Stufen (TPyP 8+A) sowie 5.3 log₁₀-Stufen (TPyP 8+B) bei *E. coli* beobachtet. Da bisher für TMPyP keine Dunkeltoxizität in diesem Konzentrationsbereich in der Literatur beschrieben wurde, wurden für alle drei Photosensibilisatoren zusätzliche Kontrollexperimente durchgeführt, um einen möglichen Einflusses des Lichts zu reduzieren (falsch-positives photodynamisches Ergebnis) [88, 89]. Hierzu wurden frisch ausplattierte *E. coli* Bakterien mit einer Konzentration von 0 μM , 5 μM , 10 μM , 50 μM sowie 100 μM für 60 min im Dunkeln inkubiert. Die Dunkelkontrollreihen sind in der **Abbildung 3.7** dargestellt.

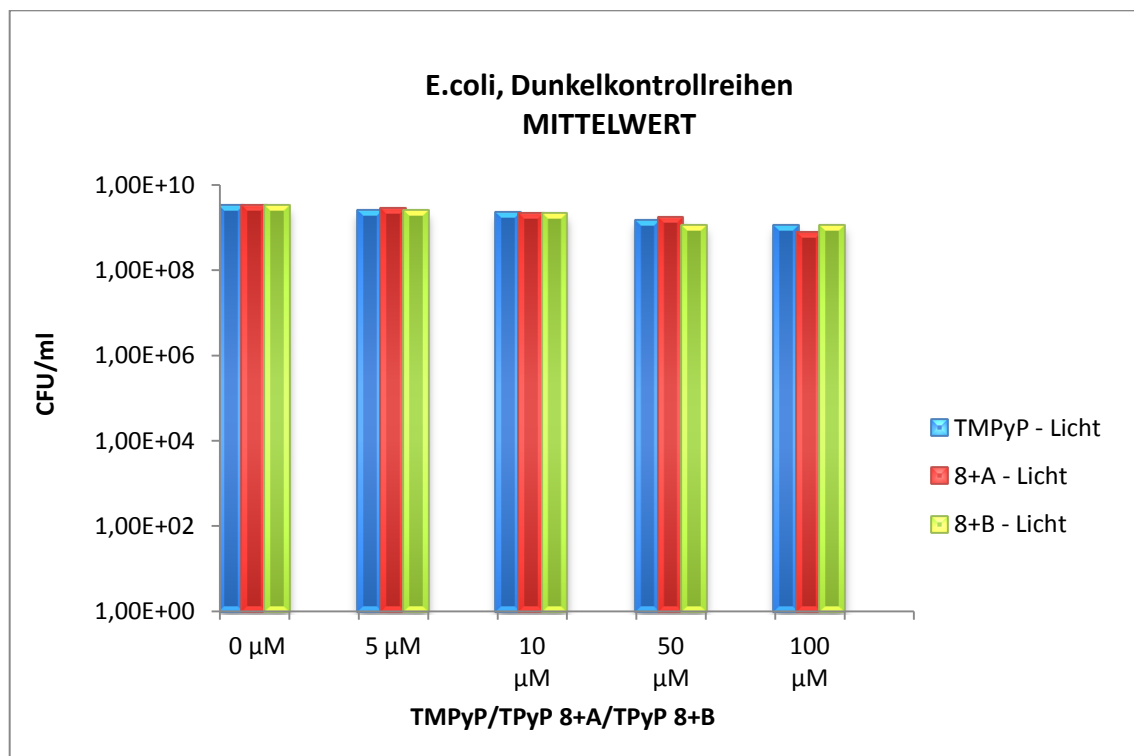
Keine der verwendeten Konzentrationen der jeweiligen Photosensibilisatoren verursachte eine Reduktion der CFU (siehe **Abb. 3.7**).

Es hatten sich zudem insbesondere bei einer IZ von 60 min mit *E. coli* bereits bei einer Konzentration von 0.5 μM und 1 μM der jeweiligen Farbstoffe nach Bestrahlung Keimreduktionen gezeigt. Dies konnte bei gleichen Bedingungen mit *S. aureus* nicht beobachtet werden. Aufgrund dessen, dass die Ergebnisse der Dunkeltoxizitäten unterschiedlich waren (vgl. **Abb. 9.5, 9.11** sowie **9.17, Kapitel 9.2** mit **Abb. 3.7**) wurden die Bestrahlungsversuche mit *E. coli* und einer IZ von 60 min nochmals unter Verwendung der neuen Versuchsbedingungen wiederholt. Dies bedeutete ein allzeit abgedunkelter Raum ohne direkte Lichtquelle während der Versuchsdurchführung sowie lichtundurchlässige Versuchsgefäße.

Die Ergebnisse der photodynamischen Inaktivierung sind für alle drei PS in der **Abbildung 3.8** ohne Dunkelkontrollen dargestellt. Die Dunkelkontrollen bei einer IZ von 60 min wurden bereits in der **Abbildung 3.7** dargestellt. Für beide Keime konnte eine

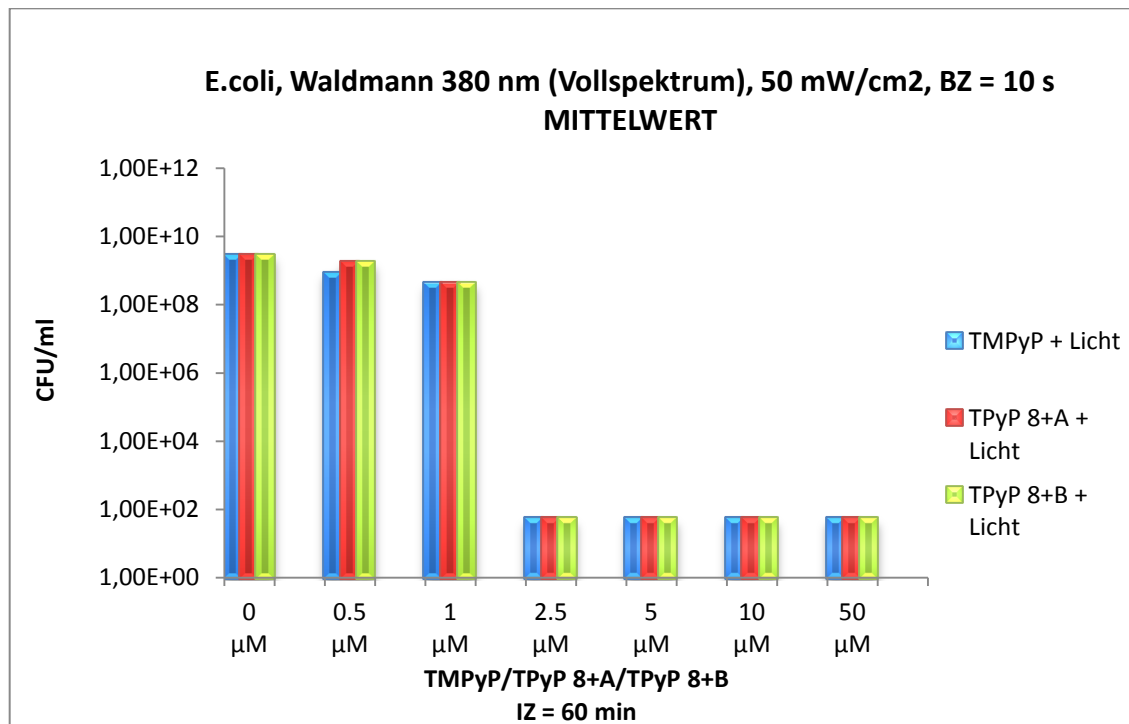
photodynamische Inaktivierung ab einer verwendeten Konzentration von 2.5 μM für alle drei Photosensibilisatoren nach Bestrahlung erreicht werden. Dies steht in Übereinstimmung mit den vorher bereits durchgeführten Experimenten. Bei den Versuchswiederholungen mit *E. coli* zeigte sich erst bei 2.5 μM eine Keimreduktion, wie es auch bei *S. aureus* beobachtet wurde.

Abb. 3.7: Dunkelkontrollreihen TMPyP, TPyP 8+A und 8+B mit *E. coli*, IZ = 60 min



Für jeden Farbstoff wurde in der Legende eine Farbe festgelegt, „-Licht“ steht für die fehlende Bestrahlung. Auf der x-Achse werden die verschiedenen Konzentrationen der PS dargestellt, auf der y-Achse die ausgezählten CFU ml⁻¹ im Zehnerlogarithmus.

Abb. 3.8: TMPyP, TPyP 8+A und 8+B mit *E. coli*, IZ = 60 min, BZ = 10 s



X-Achse: Konzentrationen der PS. Y-Achse: CFU ml⁻¹ im Zehnerlogarithmus. BZ: Bestrahlungszeit in Sekunden, IZ: Inkubationszeit in Minuten. *E. coli*: *Escherichia coli*. Für jeden Farbstoff wurde je eine Farbe festgelegt. Alle drei PS wurden jeweils nur mit *E. coli* inkubiert.

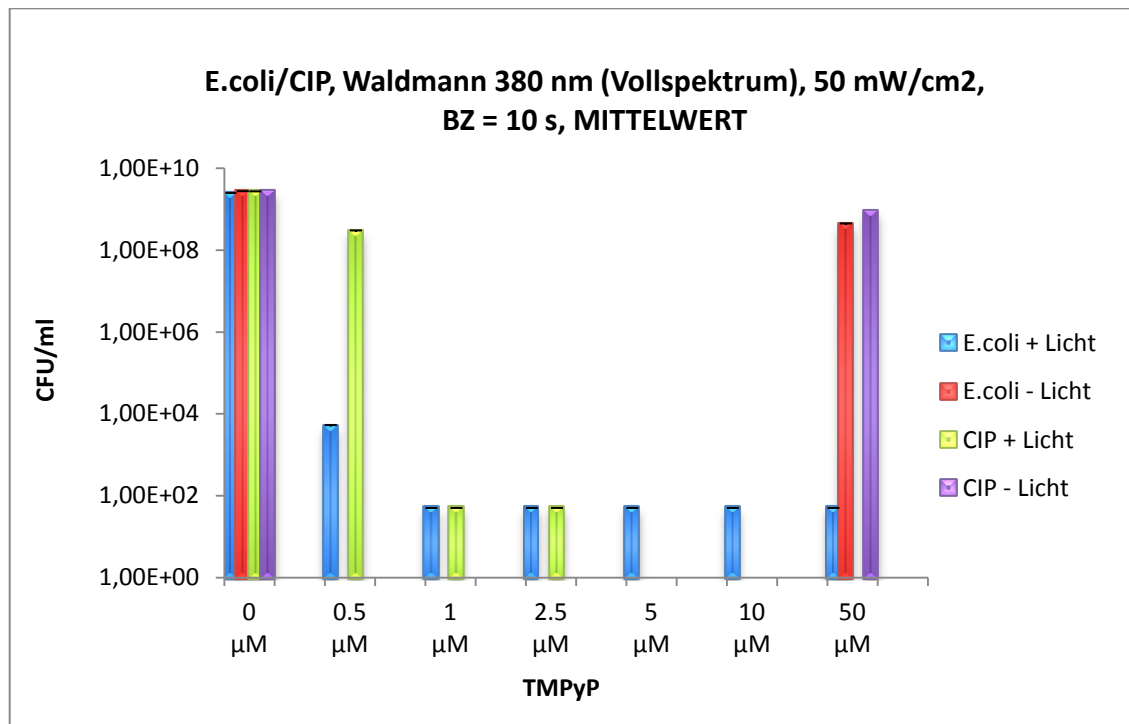
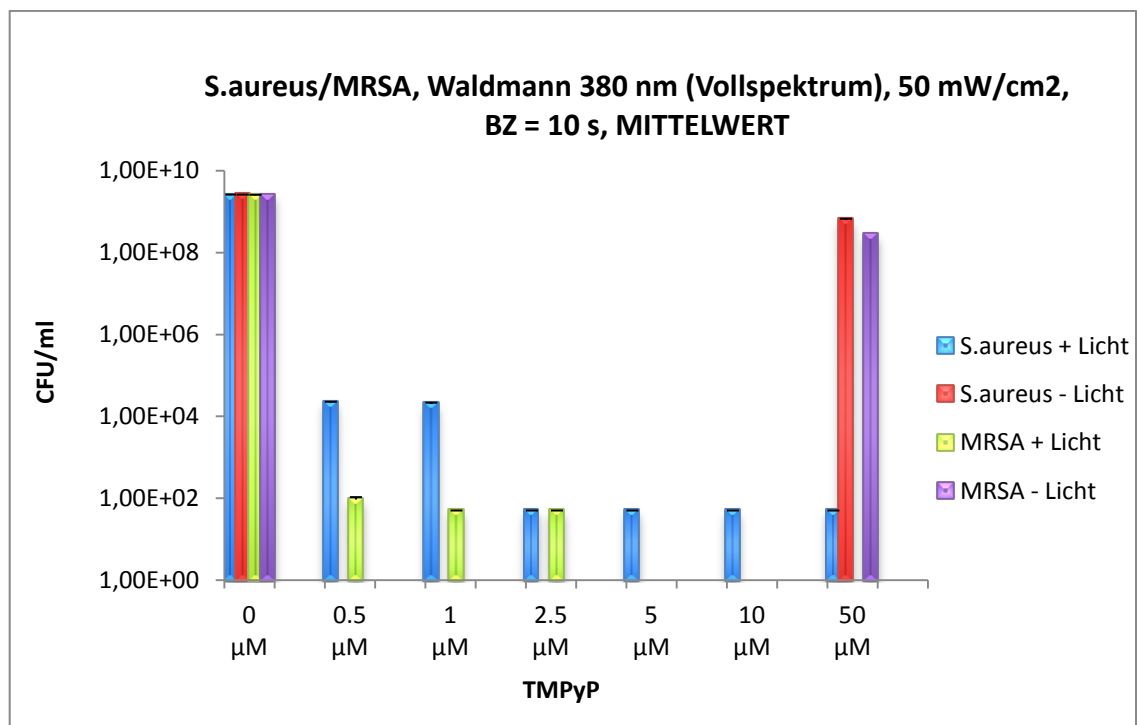
3.2 PHOTOTOXIZITÄTSTESTS *IN VITRO* mit WASCHEN

3.2.1 TMPyP

Bei den Waschversuchen wurden die Bakteriensuspensionen nach einer Inkubationszeit von 10 min bei allen Experimenten mit Waschen nochmals zweimal in Folge für je 10 min bei 13 000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, in H₂O resuspendiert und anschließend für 10 s mit der inkohärenten Lichtquelle Waldmann PIB 3000 (Emission $\lambda > 400$ nm) bestrahlt. Für *E. coli* sowie *S. aureus* wurden die gleichen Konzentrationen des Farbstoffs wie bei den Phototoxizitätstests *in vitro* ohne Waschen untersucht (0.5 μ M, 1 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M sowie 50 μ M). Die untersuchten Konzentrationen des PS für CIP und MRSA bei TMPyP (0.5 μ M, 1 μ M und 2.5 μ M) wurden entsprechend den Ergebnissen der Experimente mit *E. coli* und *S. aureus*, wie es auch schon bei den *in vitro* Experimenten ohne Waschvorgang der Fall war, ausgewählt. Für alle vier Bakterienstämme wurden jeweils Lichtkontrollen mit 0 μ M und Dunkelkontrollen mit 0 μ M und 50 μ M (höchste verwendete Konzentration) durchgeführt.

Die Ergebnisse der photodynamischen Inaktivierung von *E. coli* und CIP mittels TMPyP nach Bestrahlung sind in der **Abbildung 3.9** dargestellt. Nach Lichtaktivierung konnte mit 0.5 μ M TMPyP bei *E. coli* eine Keimreduktion von 5.7 log₁₀-Stufen erreicht werden, bei 1 μ M sogar eine Reduktion von 7.7 log₁₀-Stufen. Bei CIP konnte mit 1 μ M TMPyP eine Desinfektion nach Lichtaktivierung, das heißt eine Reduktion der Bakterien um 7.7 log₁₀-Stufen erzielt werden.

Die Ergebnisse der photodynamischen Inaktivierung von *S. aureus* und MRSA sind in der **Abbildung 3.10** dargestellt. Bei *S. aureus* wurde mit 0.5 μ M TMPyP eine Desinfektion erreicht (Reduktion um 5.1 log₁₀-Stufen), mit 2.5 μ M erfolgte eine Abtötung der Keime um 7.7 log₁₀-Stufen. Bei MRSA wurde bereits mit 0.5 μ M TMPyP eine Keimreduktion um 7.4 log₁₀-Stufen erzielt. Wie erwartet hatten TMPyP alleine (Dunkelkontrolle), als auch die Bestrahlung alleine (Lichtkontrolle) keinen Einfluss auf die Vitalität der Bakterien.

Abb. 3.9: TMPyP mit *E. coli* und CIP mit Waschen, IZ = 10 min, BZ = 10 s**Abb. 3.10:** TMPyP mit *S. aureus* und MRSA mit Waschen, IZ = 10 min, BZ = 10 s

3.2.2 TPyP 8+A

TPyP 8+A wurde bei den Waschversuchen *in vitro* unter gleichen Bedingungen wie TMPyP untersucht, mit der Ausnahme, dass bei CIP und MRSA nur 0.5 μM und 1 μM des PS untersucht wurden. Dies ist wiederum auf die Auswahl der Parameter hinsichtlich der erzielten Ergebnisse der Experimente mit *E. coli* sowie *S. aureus* zurückzuführen, da sich bei den zuvor durchgeführten Experimenten mit *E. coli* und *S. aureus* gezeigt hatte, dass mit einer Steigerung der Konzentration von TPyP 8+A keine bessere antibakterielle Wirkung erzielt werden konnte.

Für alle vier Bakterienstämme wurden jeweils Lichtkontrollen bei 0 μM und Dunkelkontrollen bei 0 μM und 50 μM durchgeführt. Bei *E. coli* und CIP konnte bereits mit 0.5 μM TPyP 8+A eine Keimreduktion von 6.9 \log_{10} -Stufen bzw. 7.7 \log_{10} -Stufen nach Belichtung erzielt werden, in der Dunkelkontrolle zeigte TPyP 8+A bei *E. coli* jedoch eine Dunkeltoxizität von 4.8 \log_{10} -Stufen. Die Ergebnisse sind in der **Abbildung 3.11** dargestellt. Aufgrund der festgestellten Dunkeltoxizität wurden die Experimente mit *E. coli* unter modifizierten Bedingungen bezüglich der Abdunkelung erneut durchgeführt, wobei sich nach dreimaligem Wiederholen keine Dunkeltoxizität zeigte (**Abb. 3.13**). Als Referenz wurden die Ergebnisse von TMPyP herangezogen (**Abb. 3.7**). Bei den geänderten Bedingungen handelte es sich analog zu den Dunkeltoxizitätsversuchen um eine strikte Abdunkelung des Labors ohne direkte Lichteinstrahlung während der Versuchsdurchführung sowie lichtundurchlässige Reaktionsgefäße. Die Ergebnisse der photodynamischen Inaktivierung von *S. aureus* und MRSA sind in der **Abbildung 3.12** dargestellt. Bei *S. aureus* und MRSA konnte ebenfalls mit 0.5 μM TPyP 8+A bereits eine desinfizierende Wirkung nach Lichtaktivierung erreicht werden, da eine Reduktion der Bakterien um 5.8 \log_{10} -Stufen bei *S. aureus* und 6.1 \log_{10} -Stufen bei MRSA erreicht wurde. Mit 1 μM des PS nach Belichtung steigerte sich die antibakterielle Wirkung auf 7.7 \log_{10} -Stufen bei beiden Keimen.

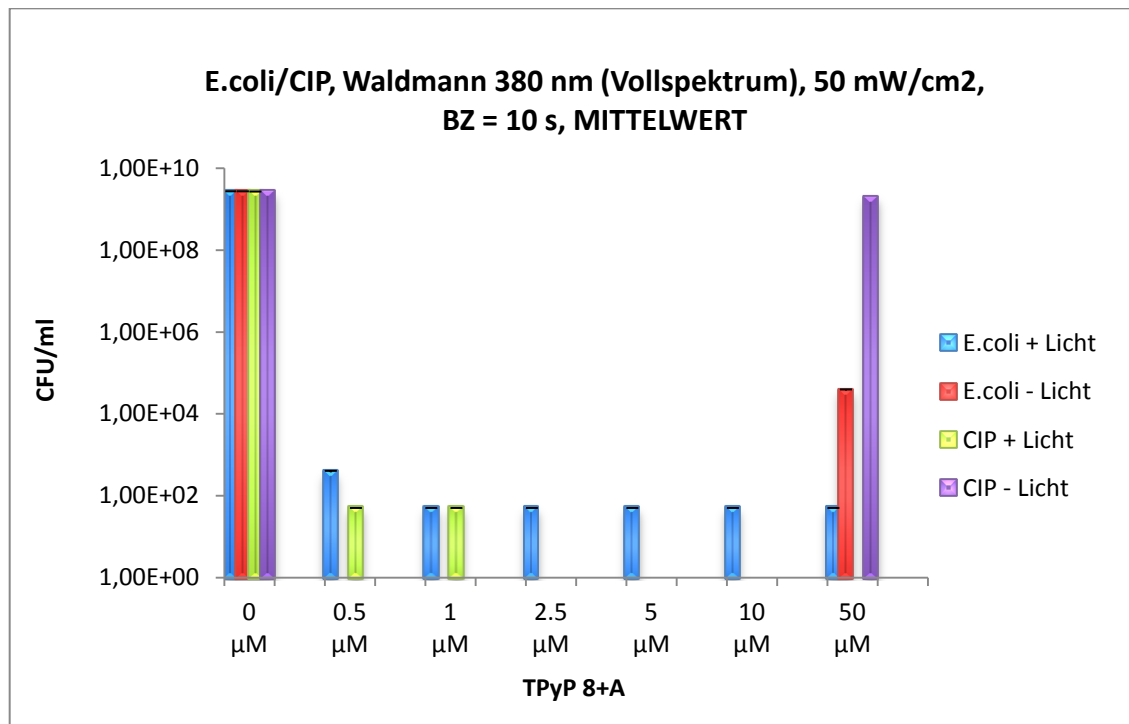
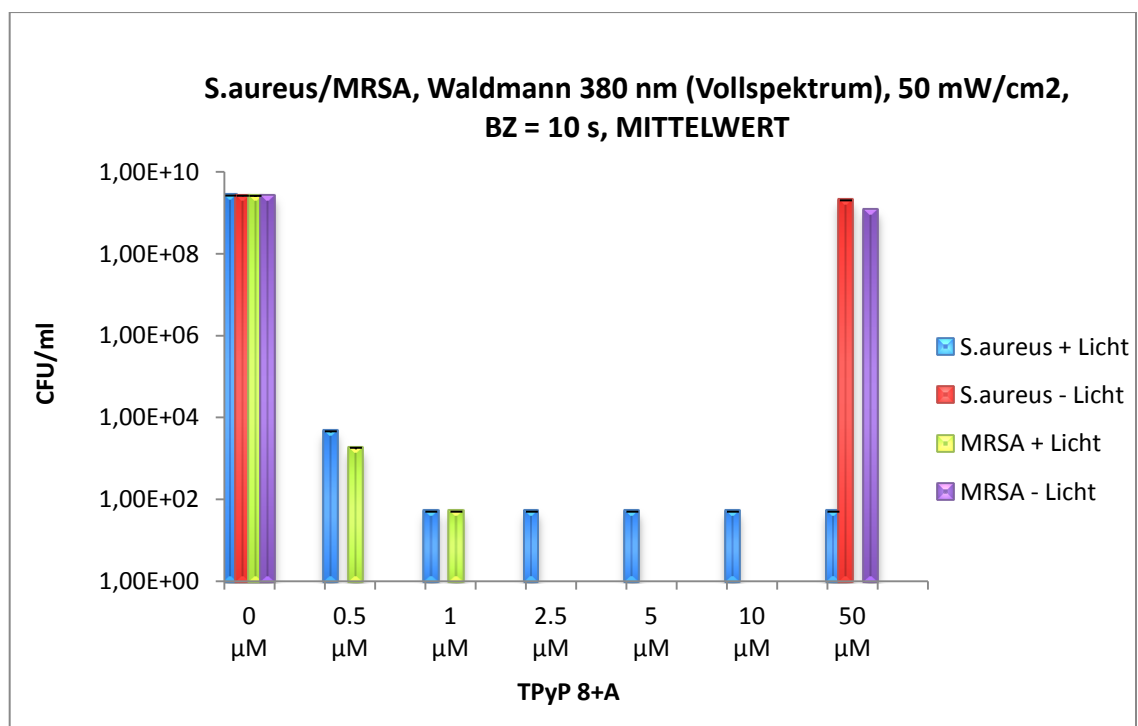
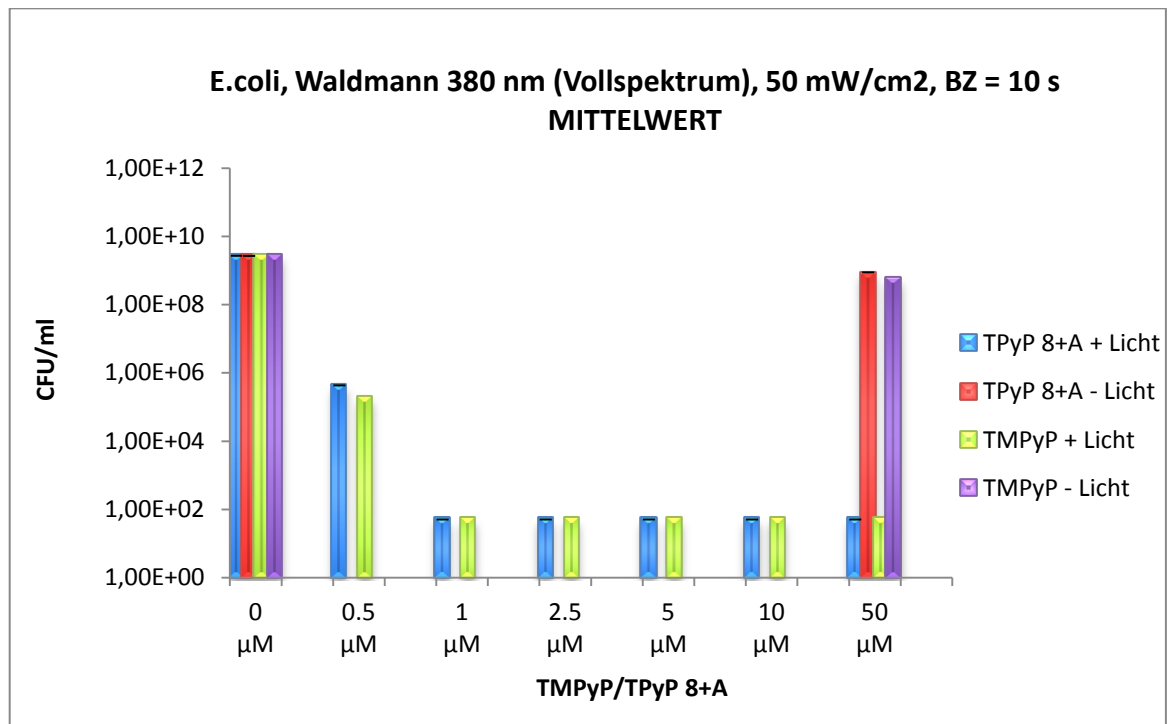
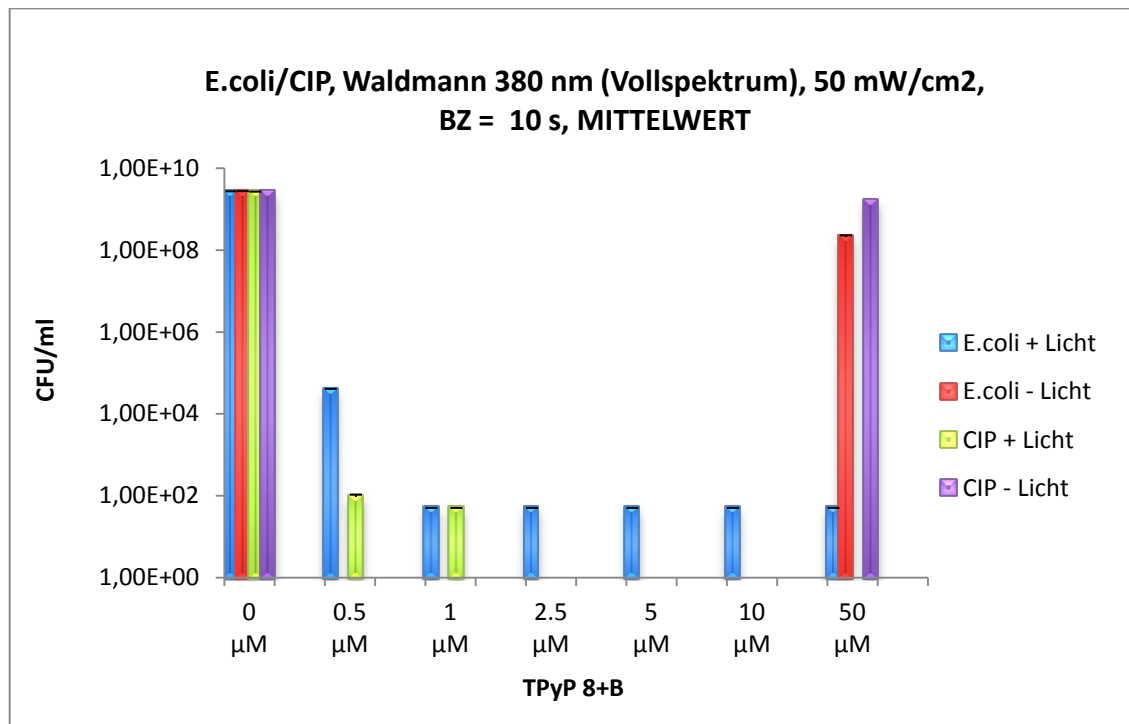
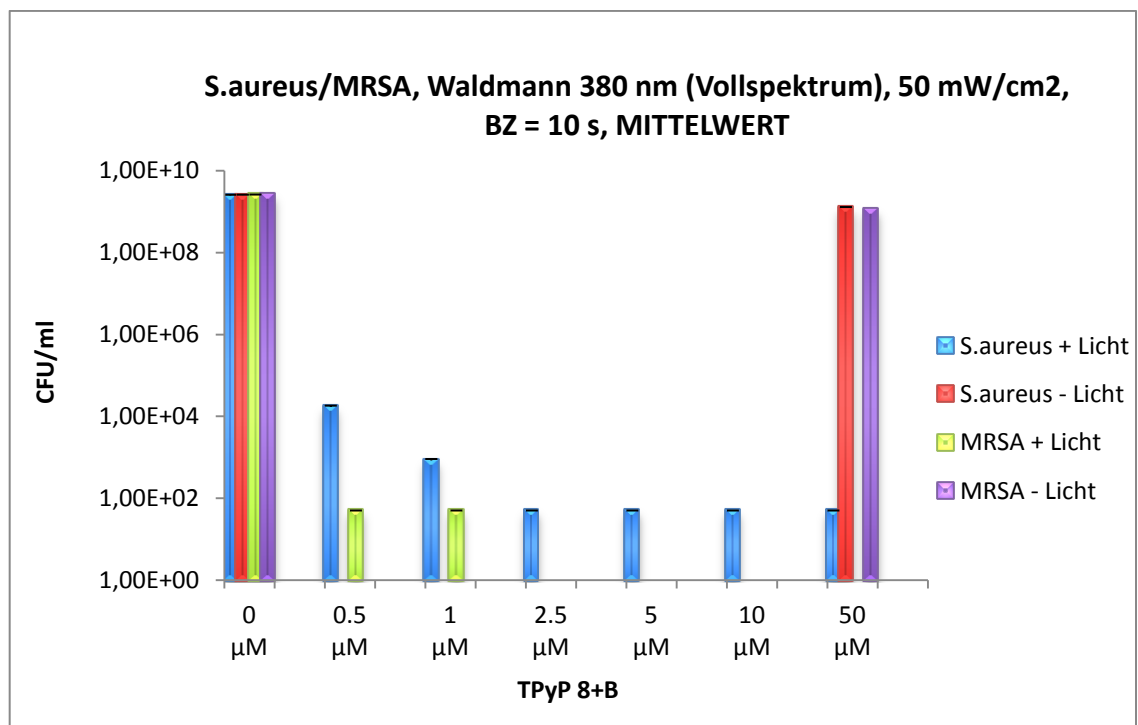
Abb. 3.11: TPyP 8+A mit *E. coli* und CIP mit Waschen, IZ = 10 min, BZ = 10 s**Abb. 3.12:** TPyP 8+A mit *S. aureus* und MRSA mit Waschen, IZ = 10 min, BZ = 10 s

Abb. 3.13: TMPyP und TPyP 8+A mit *E. coli* mit Waschen, IZ = 10 min, BZ = 10 s

3.2.3 TPyP 8+B

Die Versuche mit TPyP 8+B wurden analog zu den Versuchen mit TPyP 8+A durchgeführt. Die untersuchten Konzentrationen des PS sowie die Inkubationszeit wurden nicht verändert. Mit 0.5 µM TPyP 8+B konnte bei *E. coli* nur eine Bakterienreduktion um 4.8 log₁₀-Stufen erreicht werden, bei 1 µM TPyP 8+B jedoch um 7.7 log₁₀-Stufen nach Belichtung. CIP wurde mit 0.5 µM des PS bereits um 7.5 log₁₀-Stufen reduziert. Die Ergebnisse der photodynamischen Inaktivierung von *E. coli* und CIP sind in der **Abbildung 3.14** dargestellt.

Bei *S. aureus* fand mit 0.5 µM TPyP 8+B bereits eine Keimreduktion von 5.1 log₁₀-Stufen nach Lichtaktivierung statt, bei 1 µM TPyP 8+B um 6.5 log₁₀-Stufen. Bei MRSA konnte bereits mit 0.5 µM des PS eine effiziente Bakterienreduktion um 7.7 log₁₀-Stufen erzielt werden, siehe **Abb. 3.15**. Mit TPyP 8+B konnte keine Dunkeltoxizität detektiert werden (Reduktion < eine log₁₀-Stufe).

Abb. 3.14: TPyP 8+B mit *E. coli* und CIP mit Waschen, IZ = 10 min, BZ = 10 s**Abb. 3.15:** TPyP 8+B mit *S. aureus* und MRSA mit Waschen, IZ = 10 min, BZ = 10 s

3.3 ZUSAMMENFASSUNG der *IN VITRO* EXPERIMENTE

Insgesamt zeigte sich bei den Ergebnissen der *in vitro* Experimente, dass sich mit den zwei neuen TMPyP-Derivate bei der kürzesten Inkubationszeit von 30 s eine bessere photodynamische Wirkung erzielen ließ als mit TMPyP. Mit den neuen Photosensibilisatoren TPyP 8+A sowie 8+B war mit jeweils nur 2.5 μM nach Lichtaktivierung für alle vier untersuchten Bakterienstämme eine desinfizierende Wirkung erzielt worden, mit TMPyP waren für denselben Effekt nach Bestrahlung 5 μM notwendig. Bei den längeren Inkubationszeiten von 10 min sowie 60 min hingegen konnte kein Unterschied zwischen den drei getesteten Photosensibilisatoren festgestellt werden. Eine Keimreduktion von über 5 \log_{10} -Stufen wurde bei allen drei Farbstoffen mit einer Konzentration von 2.5 μM nach Lichtaktivierung erreicht, auch in diesem Fall für alle vier untersuchten Bakterienstämme. Eine zunächst beobachtete Dunkeltoxizität war bei einer IZ von 60 min mit *E. coli* nach erneuten Wiederholungen der Experimente nicht reproduzierbar. Zudem konnten bei allen drei Photosensibilisatoren bei den Experimenten mit *E. coli* zunächst bessere Ergebnisse im Vergleich mit *S. aureus* festgestellt werden. So wurde bei einer IZ von 60 min mit einer Konzentration von 1 μM TMPyP bei *E. coli* bereits eine Keimreduktion von über 4 \log_{10} -Stufen erzielt, was jedoch für einen desinfizierenden Effekt nicht ausreichend war. Unter denselben Bedingungen konnte mit *S. aureus* keine \log_{10} -Stufenreduktion erreicht werden. In der **Tabelle 3.5** sind die erreichten \log_{10} -Stufenreduktionen $\geq 4 \log_{10}$ -Stufen für eine bessere Übersicht zusammengefasst.

Bei den Waschversuchen zeigte sich ein inhomogeneres Bild: Mit 0.5 μM TMPyP konnte bei *E. coli* eine Keimreduktion von über 5 \log_{10} -Stufen nach Belichtung erreicht werden, bei CIP war 1 μM vonnöten. Bei *S. aureus* und MRSA wurde ebenfalls mit 0.5 μM TMPyP eine Desinfektion erzielt. Lichtaktiviertes TPyP 8+A bewirkte bei allen vier Keimen eine desinfizierende Wirkung bei einer Konzentration von 0.5 μM . Auch hier zeigte sich bei den ersten Versuchsdurchläufen eine Dunkeltoxizität, welche nach geänderten Versuchsbedingungen nicht reproduzierbar war. Mit TPyP 8+B konnten CIP, MRSA sowie *S. aureus* mit 0.5 μM von über 5 \log_{10} -Stufen nach Lichtaktivierung reduziert werden. Bei *E. coli* wurde nur eine Bakterienreduktion von 4.8 \log_{10} -Stufen erreicht; mit 1 μM wurde hier dagegen ebenfalls eine desinfizierende Wirkung nach Bestrahlung erreicht.

Tab. 3.5: Erreichte log₁₀-Stufenreduktion über 4 log₁₀-Stufen mit *E.coli*

Farbstoff	IZ*	Konzentration des PS	Erreichte log ₁₀ -Stufenreduktion
TMPyP	60 min	1 µM	4.1 log ₁₀ -Stufen
TPyP 8+A	30 s	1 µM	4.3 log ₁₀ -Stufen
TPyP 8+A	10 min	1 µM	5.7 log ₁₀ -Stufen
TPyP 8+A	60 min	0.5 µM	4.5 log ₁₀ -Stufen
TPyP 8+A	60 min	1 µM	6.6 log ₁₀ -Stufen
TPyP 8+B	10 min	1 µM	4.7 log ₁₀ -Stufen
TPyP 8+B	60 min	1 µM	5.5 log ₁₀ -Stufen

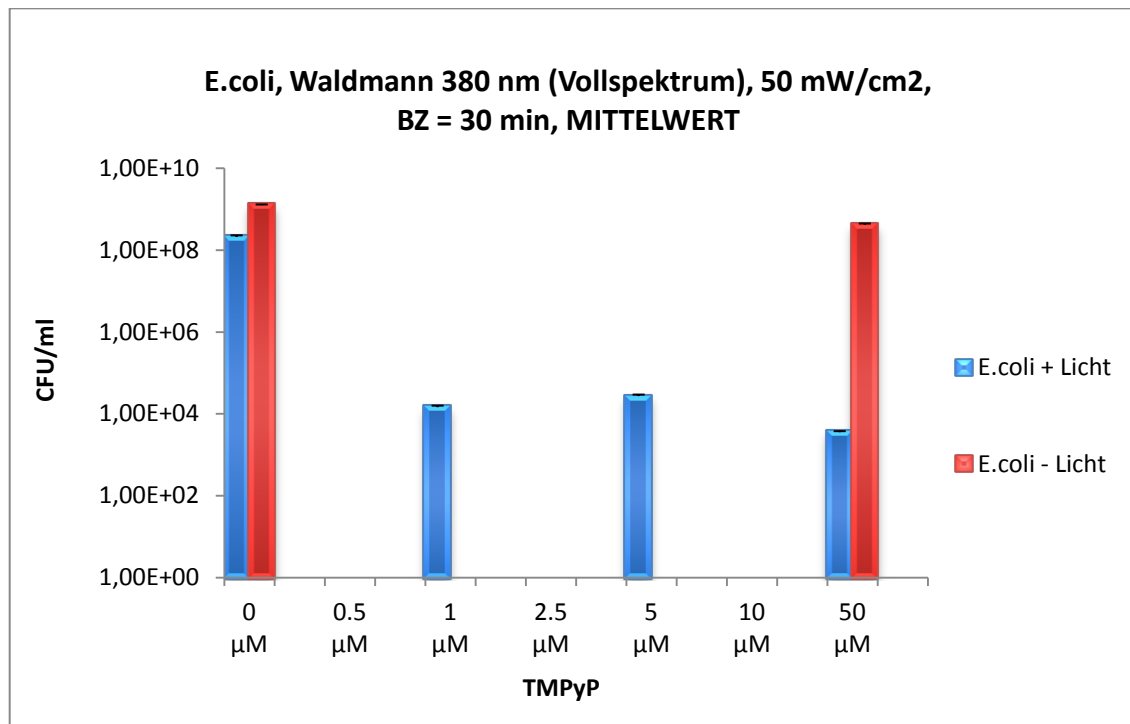
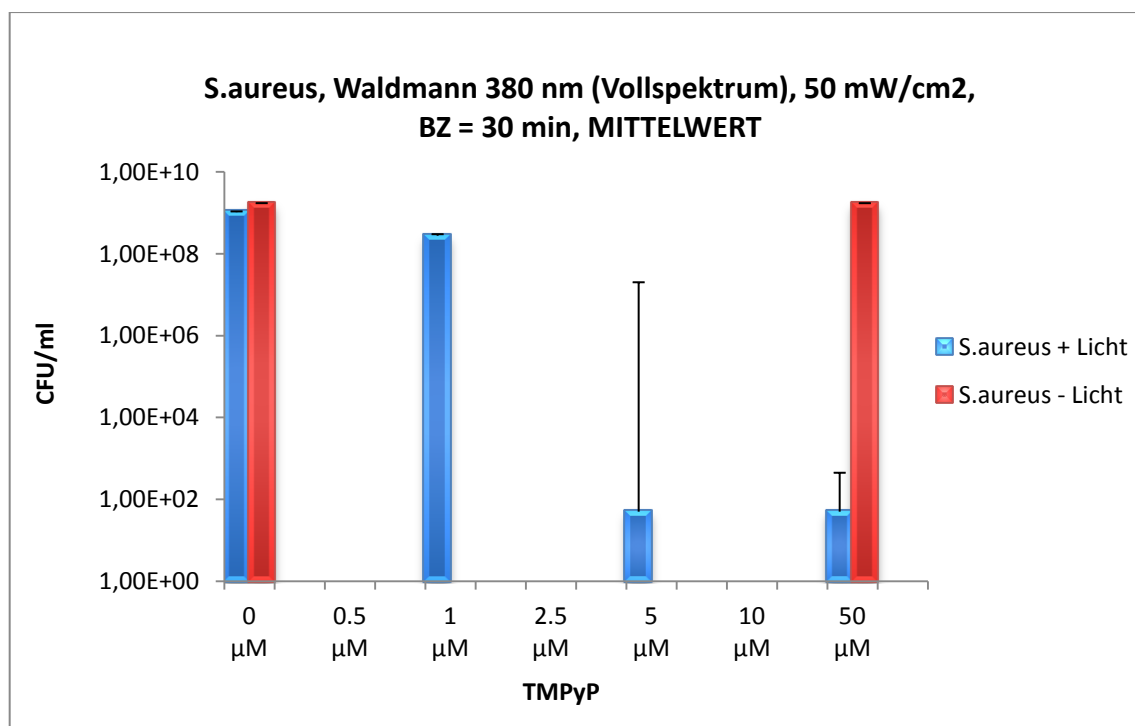
*IZ: Inkubationszeit des PS

3.4 PHOTOTOXIZITÄTSTESTS *EX VIVO* mit SCHWEINEHAUT

Im Rahmen dieser Experimente sollte die Dekolonisierung von zuvor applizierten Bakterien auf einem *ex vivo* Schweinehautmodell in Hinblick auf eine zukünftige klinische Anwendung untersucht werden. Es zeigte sich bei den *ex vivo* Schweinehautversuchen nach 30 min Bestrahlungszeit ein Temperaturanstieg der Hautproben von 10°C +/- 1,5°C durch die Wärmeausstrahlung der Lampe. Dies wurde mithilfe eines Infrarotthermometers gemessen.

3.4.1 TMPyP

Bei den *ex vivo* Schweinehautversuchen wurden 1 µM, 5 µM und 50 µM von TMPyP für 30 min auf der Haut mit den getrockneten Bakteriensuspensionen von *E. coli* sowie *S. aureus* inkubiert und anschließend für 30 min mit der inkohärenten Lichtquelle Waldmann PIB 3000 (Emission $\lambda > 400$ nm) bestrahlt. Es wurde je eine Licht- und eine Dunkelkontrolle bei 0 µM und bei 50 µM TMPyP durchgeführt. Die Ergebnisse der photodynamischen Dekolonisierung von *E. coli* und *S. aureus* sind in den **Abbildungen 3.16** und **3.17** dargestellt. Bei *E. coli* zeigte sich bei 1 µM TMPyP eine Keimreduktion von über 4 log₁₀-Stufen, ebenso wie bei 5 µM und 50 µM des PS. Bei *S. aureus* erfolgte mit 5 µM TMPyP eine Keimreduktion um 7.3 log₁₀-Stufen, jedoch mit einer Standardabweichung von ± 7 log₁₀-Stufen, was für größere Abweichungen zwischen den Versuchswiederholungen spricht. Bei 1 µM des PS zeigte sich keine photodynamische Wirkung (Reduktion < 1 log₁₀-Stufe).

Abb. 3.16: TMPyP mit *E. coli* ex vivo, IZ = 30 min, BZ = 30 min**Abb. 3.17:** TMPyP mit *S. aureus* ex vivo, IZ = 30 min, BZ = 30 min

3.4.2 TPyP 8+A

Die Ergebnisse der photodynamischen Dekolonisierung von *E. coli* und *S. aureus* unter Verwendung von TPyP 8+A sind in den **Abbildungen 3.18** und **3.19** gezeigt. Bei den Versuchen mit TPyP 8+A am *ex vivo* Schweinehautmodell wurde bei *E. coli* mit 1 μM TPyP 8+A nach Belichtung eine Bakterienreduktion um 4.3 \log_{10} -Stufen erreicht, bei 5 μM um 5.1 \log_{10} -Stufen und bei 50 μM um 5.8 \log_{10} -Stufen. Die Dunkelkontrolle zeigte eine Dunkeltoxizität (Reduktion der Bakterien 4.3 \log_{10} -Stufen). Bei *S. aureus* wurde mit 5 μM des PS eine Keimreduktion von 7.2 \log_{10} -Stufen erreicht, hier zeigte sich keine Dunkeltoxizität.

Abb. 3.18: TPyP 8+A mit *E. coli ex vivo*, IZ = 30 min, BZ = 30 min

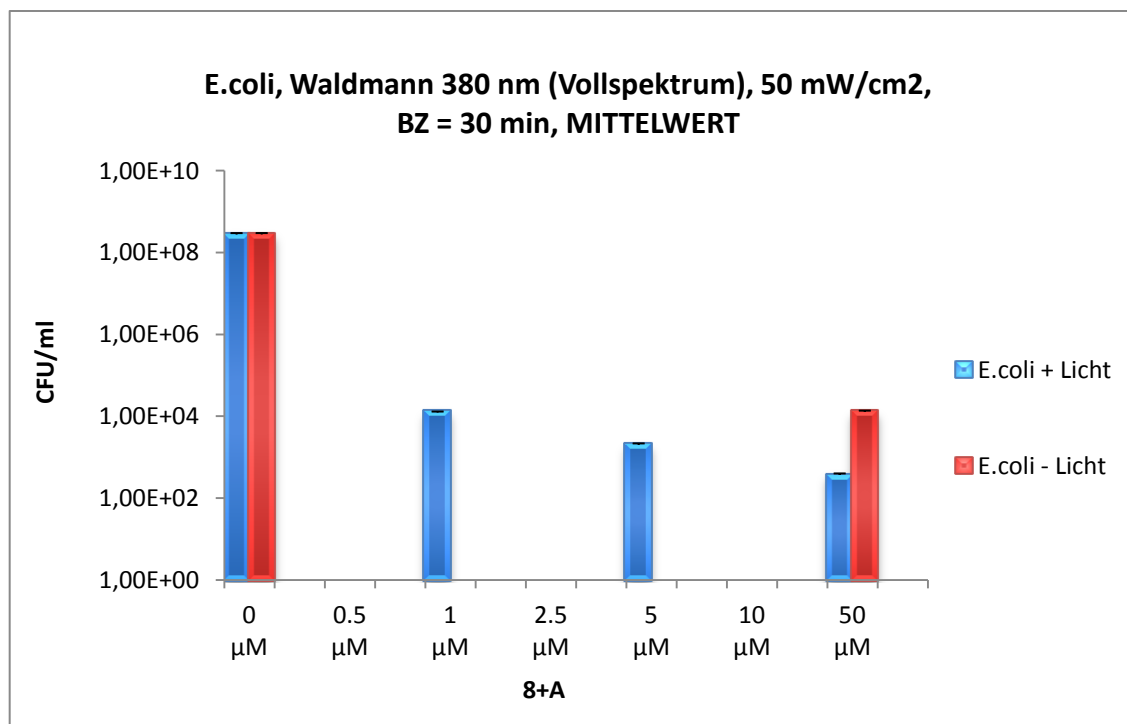
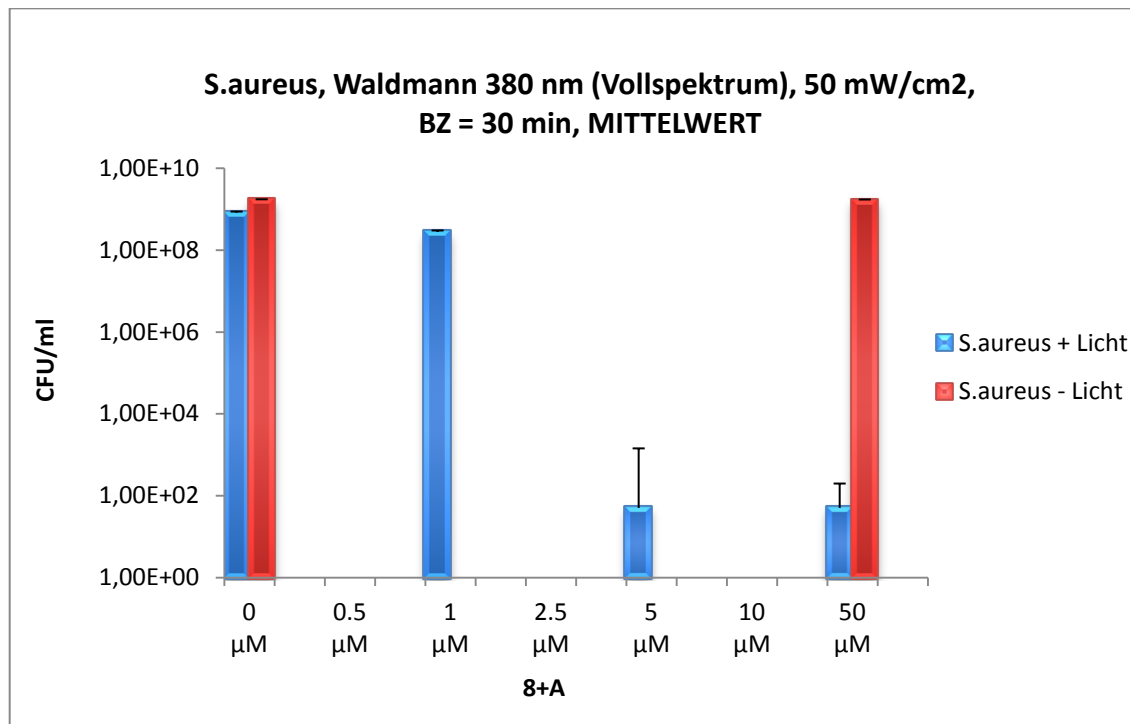
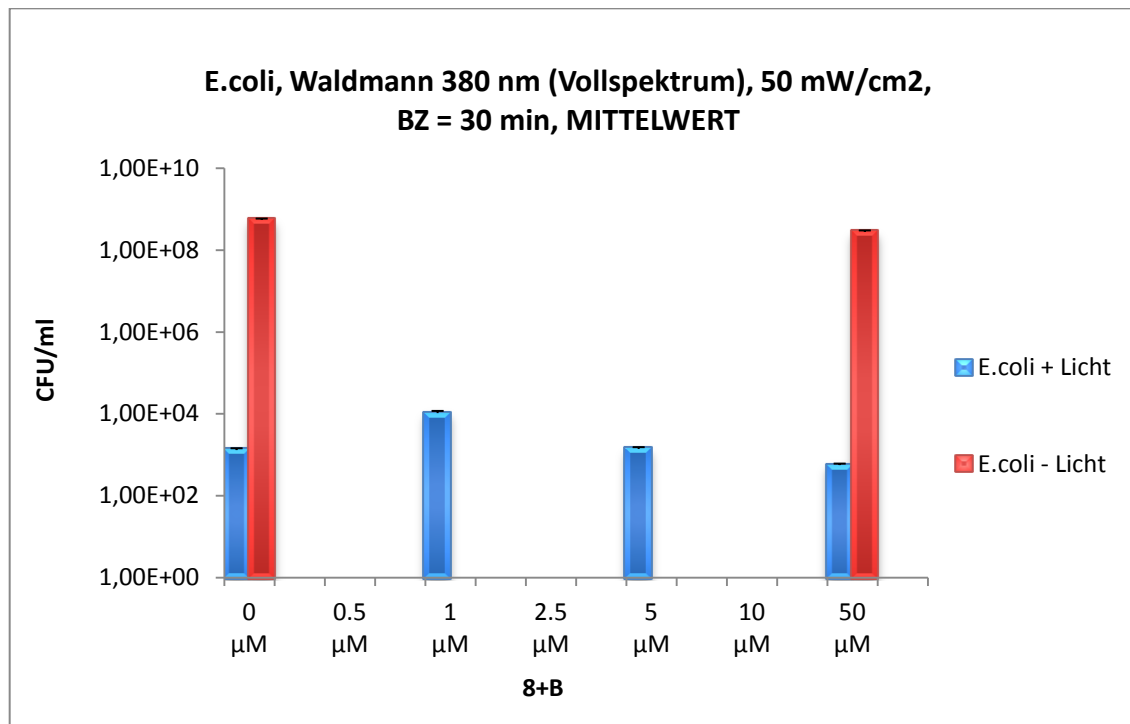


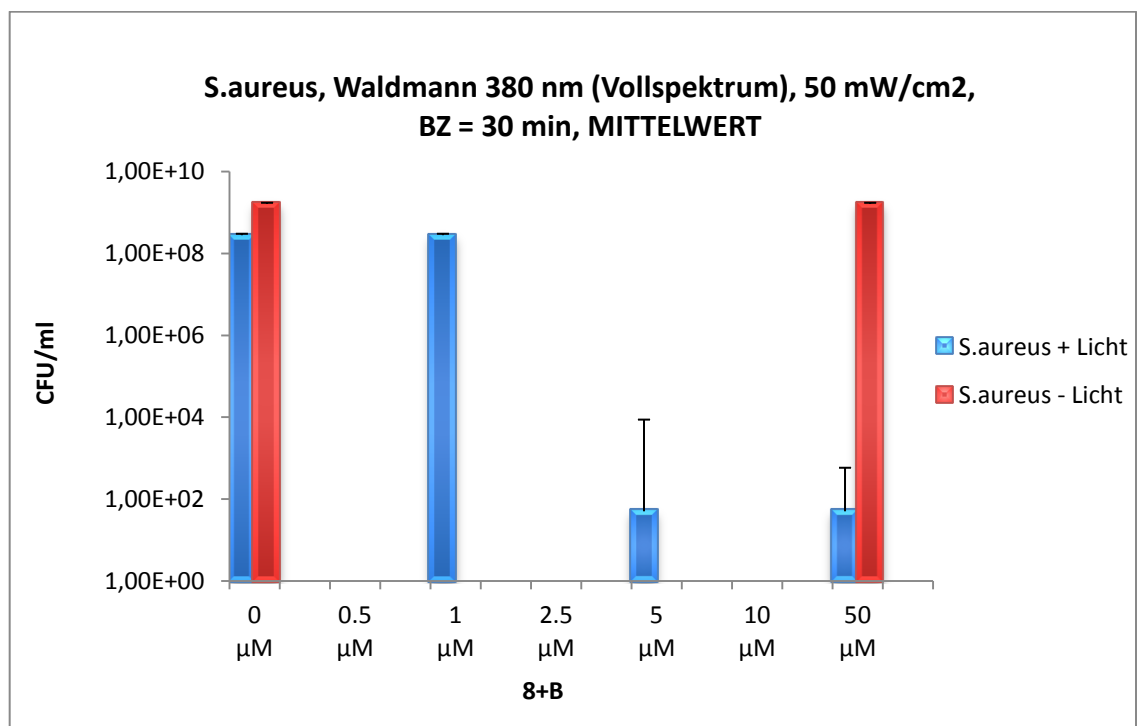
Abb. 3.19: TPyP 8+A mit *S. aureus ex vivo*, IZ = 30 min, BZ = 30 min

3.4.3 TPyP 8+B

Mit TPyP 8+B muss bei *E. coli* bereits bei 0 µM von einer reduzierten Keimanzahl ausgegangen werden, da statt mindestens 10^8 nur 10^3 Keime gewachsen sind, was an einem wiederholten Durchführungsfehler gelegen haben könnte (siehe **Kapitel 4.2**). Der Versuch wurde, wie alle Versuche zuvor auch, dreimal durchgeführt. Von 1 µM zu 50 µM fand eine Bakterienreduktion von einer \log_{10} -Stufe statt. Die Dunkelkontrollen zeigten keine Keimreduktion. Bei *S. aureus* konnte bei 1 µM keine photodynamische Wirkung erzielt werden, bei 5 µM erfolgte eine Keimreduktion von 6.7 \log_{10} -Stufen. Hier zeigte sich ebenfalls keine Dunkeltoxizität. Die Ergebnisse werden in den **Abbildungen 3.20** und **3.21** dargestellt.

Abb. 3.20: TPyP 8+B mit *E. coli* ex vivo, IZ = 30 min, BZ = 30 min, N = 3*

*N = Anzahl der Versuchswiederholungen

Abb. 3.21: TPyP 8+B mit *S. aureus* ex vivo, IZ = 30 min, BZ = 30 min

3.5 ZUSAMMENFASSUNG der *EX VIVO* EXPERIMENTE

Im Rahmen der photodynamischen Dekolonisierung von *E. coli* und MRSA am *ex vivo* Schweinehautmodell konnte eine photodynamische Inaktivierung der applizierten Keime gezeigt werden. Nicht nur für TMPyP sondern auch für die neuen Porphyrin-Derivate konnte mit diesem „Machbarkeitsexperiment“ eine mögliche photodynamische Dekolonisierung an einem Hautmodell gezeigt werden. Mögliche Optimierungen des Versuchsablaufs zur Vermeidung der Schwankungen in den Ergebnissen im Vergleich mit den *in vitro* Experimenten sowie in Hinblick auf eine zukünftige klinische Anwendung werden im folgenden Kapitel diskutiert.

4 DISKUSSION

4.1 PHOTOTOXIZITÄTSTESTS *IN VITRO*

In dieser Arbeit wurden zwei neu synthetisierte TMPyP-Derivate hinsichtlich ihrer photodynamischen Effektivität untersucht und mit TMPyP, dem Referenzfarbstoff, verglichen. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass kationische Porphyrine bessere Ergebnisse zur photodynamischen Abtötung von Keimen im Gegensatz zu neutralen oder anionischen Porphyrinen erzielten [80]. Malik *et al.* bemerkten, dass das größte Hindernis der neutral und negativ geladenen Porphyrin-basierenden PS für die klinische Anwendung die fehlende Wirksamkeit im Gram-negativen Bereich wäre [108]. Daraufhin verglichen Merchat *et al.* zwei kationische Porphyrine, einer davon TMPyP, mit einem negativ geladenen Porphyrin [80]. Es zeigte sich bei den kationischen Porphyrinen, dass sich die Ergebnisse bei Gram-positiven Bakterien im Vergleich mit anderen nicht-kationischen Porphyrinen kaum unterschieden. Bei Gram-negativen Bakterien zeigte sich jedoch ein positiver photodynamischer Effekt: Ohne zusätzliche Substanzen konnten man diese Keime erfolgreich abtöten [80]. In einer zweiten Arbeit konstatierten Merchat *et al.*, dass die Unterschiede zwischen positiv und negativ geladenen Porphyrinen nicht in den physikalischen Eigenschaften, wie der Quantenausbeute oder der Photostabilität lag, denn es zeigten sich nur geringe Differenzen zwischen den unterschiedlichen PS. Die Arbeitsgruppe bemerkte, dass die positive Ladung des PS eine elektrostatische Bindung zwischen PS und der negativ geladenen Zellwand Gram-negativer Keime begünstigen würde [85]. Auf diesem Wissen basierend wurden nun für die vorliegende Arbeit zwei neue kationische Porphyrine mit acht positiven Ladungen synthetisiert, TPyP 8+A sowie TPyP 8+B und mit dem bereits gut bekannten vierfach-positiven Porphyrin TMPyP verglichen.

Mit allen drei untersuchten Photosensibilisatoren wurde das Ziel einer Keimreduktion von $\geq 5 \log_{10}$ -Stufen erreicht. Es waren jedoch unterschiedliche Konzentrationen des jeweiligen PS für die gleiche Wirkung notwendig. Bei einer Inkubationszeit von 30 s zeigten sich Unterschiede zwischen dem Referenzfarbstoff TMPyP und den neu synthetisierten TMPyP-Derivaten TPyP 8+A und TPyP 8+B. Die Keimreduktion um $\geq 5 \log_{10}$ -Stufen wurde bei TMPyP mit einer Konzentration von 5 μM erreicht. Bei beiden untersuchten TMPyP-Derivaten wurde diese Wirkung bereits mit 2.5 μM erzielt. Die Experimente mit

Inkubationszeiten von 10 min sowie 60 min zeigten hingegen keine Unterschiede: Bei allen drei Farbstoffen konnte mit einer Konzentration von 2.5 μM des jeweiligen Photosensibilisators eine suffiziente Keimreduktion für eine Desinfektion erreicht werden. Dies zeigt, dass bei einer kurzen Inkubationszeit von lediglich 30 s die neuen PS mit acht positiven Ladungen an den Seitenketten einen Vorteil gegenüber TMPyP mit nur vier positiven Ladungen haben. Die verbesserte Wirkung innerhalb dieser kurzen IZ kann von einer höheren elektrostatischen Anziehung zwischen PS und Bakterienzellwand herrühren, wie sie auch schon bei Merchat *et al.* erstmals beschrieben wurde [85]. Dadurch wird vermutlich eine verbesserte Anlagerung zwischen diesen beiden erzeugt, was zu kürzeren Diffusionsstrecken von Singulett-Sauerstoff und anderen Sauerstoffradikalen führt, welche dann an Ort und Stelle die Bakterien oxidieren können [51]. Bei längeren Inkubationszeiten scheint die höhere positive Ladung hingegen keinen Vorteil mehr zu erbringen.

Im Vergleich mit anderen Arbeiten stellt sich die Frage, ob eine höhere Anzahl an positiven Ladungen tatsächlich einen Vorteil in Hinblick auf die Effektivität bringt. Banfi *et al.* verglichen in ihrer Arbeit ebenfalls mehrere Porphyrin-Farbstoffe miteinander, unter anderem TMPyP sowie drei weitere tetra-kationische, ein di-kationisches sowie ein anionisches Porphyrin zur Kontrolle. Letzteres zeigte wie erwartet die geringste photodynamische Wirkung, was nochmals die Wichtigkeit positiver Ladungen an Porphyrin-Farbstoffen bekräftigte. In der Arbeit von Banfi *et al.* dienten *E. coli* sowie *S. aureus* als Zielorganismen. *E. coli* wurde für 60 min bestrahlt und *S. aureus* für 30 min, jeweils mit einer 500 Watt-Halogenlampe. Die Inkubationszeiten betrugen 30, 60 sowie 90 min, was jedoch keinen Unterschied im Ergebnis der antibakteriellen Wirkung zeigte. Zudem wurde ein Waschvorgang durchgeführt. Für TMPyP wurde eine Konzentration von 7.33 μM gewählt. Damit erreichten Banfi *et al.* bei *E. coli* eine Reduktion von 3 – 4 \log_{10} -Stufen. Mit den anderen untersuchten vierfach- sowie zweifach kationischen Porphyrinen wurde dieselbe Wirkung bereits mit Konzentrationen von 0.4 – 1.7 μM der jeweiligen PS erreicht. TMPyP konnte *S. aureus* mit 7.33 μM nur um eine \log_{10} -Stufe reduzieren. Die anderen vierfach positiven und das zweifach positive PS erzielten eine Reduktion um 7 \log_{10} -Stufen mit deutlich niedrigeren Konzentrationen. Interessanterweise wies der zweifach-positiv geladene Farbstoff bessere Ergebnisse auf als die drei neu synthetisierten vierfach-positiv geladenen Porphyrine sowie TMPyP. Zudem zeigte sich bei Banfi *et al.*, dass eine leichte Lipophilie die Wirksamkeit verbesserte [109]. Im Vergleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit ist allerdings selbst die antibakterielle Wirkung des zweifach positiv geladenen PS deutlich schlechter, da mit 30 – 90 min IZ bzw. 30 – 60 min BZ deutlich längere Inkubations- sowie Bestrahlungszeiten notwendig sind. In der vorliegenden Arbeit

wurde eine desinfizierende Wirkung bereits mit einer Inkubationszeit von 30 s sowie einer Bestrahlungszeit von 10 s erreicht.

Auch scheint die angesprochene Lipophilie, welche anhand des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten angegeben wurde, keinen so entscheidenden Einfluss, wie eine hohe Anzahl an positiven Ladungen zu haben, da die zwei achtfach positiv geladenen Farbstoffe TPpP 8+A sowie 8+B insgesamt deutlich effektiver zu sein scheinen. Alves *et al.* verglichen ebenfalls verschiedene Porphyrin-Farbstoffe mit unterschiedlicher Anzahl positiver Ladungen miteinander, darunter auch TMPpP, und kamen zu dem Schluss, dass dreifach-positiv geladene Porphyrine effektiver *E. coli* sowie *Enterococcus faecalis* (Gram-positiv) inaktivierten als TMPpP. Es wurde konstatiert, dass hochgradig lipophile Substituenten in Form von aromatischen Kohlenwasserstoffketten den amphiphilen Charakter des Farbstoffs erhöhen und somit die Affinität zu den Bakterien erhöhen können. Durch die höhere Affinität schließen die Autoren auf eine höhere phototoxische Effizienz der Farbstoffe. Bei einer Konzentration von 5 μM der tri-kationischen PS wurde bei Alves *et al.* nach einer Inkubationszeit von 10 min eine Keimreduktion von über 7 \log_{10} -Stufen von *E. coli* mit einer Lichtdosis von 21.6 J cm^{-2} erreicht. Für das gleiche Resultat mit TMPpP war eine deutlich höhere Lichtdosis von 64.8 J cm^{-2} notwendig. Die Inaktivierung des Gram-positiven Keims zeigte keinen Unterschied [110]. Im Vergleich dazu reichten in dieser Doktorarbeit schon 0.5 J cm^{-2} , um eine desinfizierende Wirkung bei einer Inkubationszeit von 10 min und einer Konzentration von 5 μM des PS TMPpP zu erreichen. Bereits bei einer Inkubationszeit von 30 s konnte diese Wirkung mit TMPpP erreicht werden, bei den beiden neuen Derivaten TPpP 8+A und 8+B sogar schon mit einer Konzentration von 2.5 μM des jeweiligen PS. Warum TMPpP in dieser Arbeit deutlich bessere Ergebnisse erzielt als in der Arbeit von Alves *et al.*, ist womöglich auf die Lichtquelle zurückzuführen. Es wurden in der Arbeit von Alves *et al.* mehrere Lampen (Emission bei 380 – 700 nm) mit einer Leistung von nur 40 mW cm^{-2} parallel genutzt. Alle anderen Parameter wurden in gleicher Form durchgeführt. Ein wichtiger Faktor ist dabei die Überschneidung zwischen dem Emissionsspektrum der verwendeten Lampen und dem Absorptionsspektrum des Photosensibilisators, da nur die emittierten Photonen im richtigen Wellenlängenbereich anschließend vom PS absorbiert werden können [111]. Wenn dies nicht optimal gewählt wurde, könnte es die Unterschiede zwischen den hier erzielten Ergebnissen und der Arbeit von Alves *et al.* erklären. Zudem sind TPpP 8+A und 8+B aufgrund ihrer positiven Ladungen kaum noch lipophil, lediglich der mittige Porphyrinring weist geringe lipophile Eigenschaften auf. Dies widerspricht den Aussagen von Alves *et al.*, dass hochgradig lipophile

Substituenten mit einem hohen Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten von Vorteil sind – eine höhere positive Ladung scheint eine noch bessere Wirkung zu haben.

Die Größe des PS scheint wiederum keine Rolle für die Effektivität zu spielen, da TPyP 8+A sowie 8+B mit $1191.8 \text{ g mol}^{-1}$ und $1103.44 \text{ g mol}^{-1}$ jeweils deutlich größer als TMPyP ($684.77 \text{ g mol}^{-1}$) sind (Angaben ohne Gegenion). Bisher galt die Annahme, dass kleinere Moleküle die Bakterien besser penetrieren können [87]. Die Größe aller drei Farbstoffe steht somit nicht im Einklang mit der allgemeinen „Rule of Five“, welche unter anderem besagt, dass Arzneimittel ein Molekulargewicht von 500 g mol^{-1} in den meisten Fällen nicht überschreiten sollen [112]. Dies wirft die Frage auf, ob die Farbstoffe die Bakterien penetrieren oder ob sie sich nur an die Keime anlagern.

In Bezug zum Penetrationsverhalten wurde gezeigt, dass Gram-positive Bakterien durch ihren Zellwandaufbau eine deutlich höhere Permeabilität, beispielsweise für Antibiotika als Gram-negative Bakterien aufweisen [113]. In der Effektivität gegenüber Gram-positiven sowie Gram-negativen Bakterien gibt es in dieser Arbeit nahezu keine Unterschiede zwischen den drei Farbstoffen. *S. aureus* und MRSA sowie *E. coli* und CIP konnten jeweils gleich effektiv durch den entsprechenden Photosensibilisator eradiziert werden.

Bei allen drei PS lässt sich die Tendenz erkennen, dass eine stärkere Abnahme der überlebenden CFU erfolgt, je länger die Inkubationszeit ist. Dies kann auf eine mögliche Penetration der Farbstoffe in die Bakterien zurückzuführen sein. Daher wäre es interessant, die Lokalisierung des Farbstoffs bei den Bakterien zu untersuchen. Für eine Anlagerung nur an die Zellwand würden die kurze Inkubations- sowie Bestrahlungszeit und die Größe der Moleküle sprechen. Bei einer Inkubationszeit von 60 min wiederum ist eine Penetration aufgrund des Zeitfaktors durchaus denkbar, was im Rahmen von weiterführenden Versuchen zur Aufnahme des Farbstoffs zu verifizieren wäre. Für eine ausschließliche Anlagerung sprechen die Experimente von Pereira *et al.*, welche die Theorie unterstützen, dass die Strukturen der äußeren Zellwand von Bakterien, vor allem Lipide, Hauptangriffspunkte für die PIB sind. Die Experimente der Arbeitsgruppe um Pereira *et al.* wurden jedoch nur bei einer Inkubationszeit von 15 min durchgeführt [114].

Zudem zeigte sich bei den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit nach einer Inkubationszeit von 60 min bei *E. coli* mit TPyP 8+A sowie 8+B eine Dunkeltoxizität (siehe **Abb. 9.11** sowie **9.17**). Die Anzahl der CFUs nahm um 4 - 5 \log_{10} -Stufen ab. Dies wurde im Rahmen einer Dunkelkontrollreihe unter optimierteren Bedingungen bezüglich der Abdunkelung nochmals überprüft, woraufhin sich keine Dunkeltoxizität ergab (siehe **Abb. 3.7**). Dies könnte sich einerseits auf die Vermeidung jeglicher Lichteinstrahlung

zurückführen lassen. Andererseits könnte ein weiterer Faktor die untersuchten *E. coli* Bakterien sein. In der Regel wurden diese alle vier bis sechs Wochen frisch ausplattiert. Zur Durchführung der Dunkeltoxizitätsreihe wurden komplett frische Keime angesetzt. Ob der Zeitpunkt des Ausplattierens der Keime einen Einfluss auf die Empfindlichkeit der Bakterien auf die PIB nimmt ist fraglich. Möglicherweise lässt die Stabilität der äußeren Zellmembran von *E. coli* nach einigen Wochen nach dem Ausplattieren nach, was sie anfälliger machen könnte. Dies könnte dem Verbrauch der Nährstoffe im Medium geschuldet sein. Zudem könnte es auch einen Unterschied zwischen den exponentiell wachsenden Keimen sowie den Keimen in der stationären Phase in Hinblick auf die Effektivität der PIB geben [115]. Ansonsten wurden die Experimente unter gleichen Bedingungen durchgeführt, wodurch ein weiterer Faktor, welcher einen Einfluss auf die Dunkeltoxizität haben könnte, schwer zu reproduzieren ist. Für eine sichere klinische Anwendung und eine bessere Kontrolle der photodynamischen Inaktivierung ist es wichtig, dass nur die Kombination aus Photosensibilisator und Bestrahlung zu einer Keimreduktion führt, was erfreulicherweise bei einer kurzen Inkubationszeit von 30 s oder 10 min immer gegeben ist. Die Lichtkontrollen wiederum zeigen, dass die Bakterien nicht durch Wärmeschäden abgetötet wurden, da eine alleinige Bestrahlung keine Reduktion der überlebenden CFUs bewirkte.

Insgesamt zeigten sich mit *E. coli* bei allen drei Farbstoffen bessere Ergebnisse als bei *S. aureus*. Bei TMPyP wurde bei einer IZ von 60 min mit einer Konzentration von 1 μM bereits eine Keimreduktion von über 4 \log_{10} -Stufen beobachtet. Der Farbstoff TPyP 8+A zeigte mit *E. coli* noch bessere Ergebnisse: Bei einer IZ von 30 s zeigte sich mit 1 μM ebenfalls schon eine Reduktion von 4.3 \log_{10} -Stufen; bei einer IZ von 10 min sogar von über 5 \log_{10} -Stufen mit 1 μM . Mit einer IZ von 60 min konnte man bei einer Konzentration von 0.5 μM eine Minderung von über 4 \log_{10} -Stufen beobachten; mit 1 μM wurde eine desinfizierende Wirkung mit einer Reduktion von 6.6 \log_{10} -Stufen erreicht. Mit TPyP 8+B wurde bei einer Inkubationszeit von 10 min mit 1 μM eine Keimreduktion von 4.7 \log_{10} -Stufen erreicht und bei 60 min mit 1 μM eine Keimreduktion von 5.5 \log_{10} -Stufen. Die Ergebnisse sind in der **Tabelle 3.5, Kapitel 3.3** zusammengefasst.

Dies könnte daran liegen, dass die drei Farbstoffe durch die elektrostatische Anziehung durch die positiven Ladungen gegenüber *E. coli* effektiver sind als gegen *S. aureus*. Für TMPyP wurde jedoch in der Literatur bis jetzt lediglich eine gleichwertige Wirkung zur Abtötung der beiden Keime beschrieben; nie eine bessere Wirkung für die Eradizierung von *E. coli*. Aufgrund dessen wurden diese Versuche mit *E. coli* und einer IZ von 60 min wiederholt. Daraufhin zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Keimen. Bei einer Konzentration von 1 μM und einer IZ von 60 min wurde mit TMPyP wie oben

beschrieben im Rahmen der Versuchswiederholungen in diesem Fall keine Keimreduktion erreicht. Durch die Erfahrung mit der zunächst beobachteten Dunkeltoxizität bei 60 min mit *E. coli* stellt sich hier jedoch auch die Frage, ob es dafür ähnliche Gründe wie mit der Dunkeltoxizität mit *E. coli* bei einer IZ von 60 min geben könnte. Es wäre möglich, dass die eingesetzten *E. coli* Keime, die über zwei Wochen alt waren anfälliger für die PIB waren. Ein Hinweis darauf wäre, dass die oben beschriebenen Keimreduktionen insbesondere bei den längeren Inkubationszeiten von 10 und 60 min erfolgten. Die jeweiligen Wiederholungsversuche wurden aufgrund dessen immer mit frisch ausplattierten Keimen durchgeführt.

Bei den Waschversuchen wurde mit zwei aufeinander folgenden Waschvorgängen die Fraktion der nichtgebundenen Farbstoffmoleküle vermindert. Die Waschversuche zeigten deutlich bessere Ergebnisse bezüglich der Keimeradizierung als die Experimente ohne Waschprozedur. Dies zeigt, dass die kationischen Farbstoffe sehr gut an die Bakterienzellwand haften. Mit Konzentrationen zwischen 0.5 und 1 μM der jeweiligen PS wurde eine Keimreduktion $\geq 5 \log_{10}$ -Stufen erzielt. Für diese deutlichen Unterschiede im Vergleich mit den Phototoxizitätstests *in vitro* ohne Waschen kann es verschiedene Gründe geben. Beispielsweise ist die effektive Inkubationszeit verlängert, da zusätzlich zur eigentlichen IZ von 10 min zwei Waschzyklen mit jeweils 10 min Zentrifugierung sowie Resuspension der Präzipitate erfolgen. Insgesamt kann man durch die Durchführungsweise der Waschversuche somit von einer IZ von über 30 min ausgehen. In den Phototoxizitätstests ohne Waschen zeigte sich bereits, dass eine längere IZ zu einer erhöhten Keimreduktion führt. Des Weiteren kann man davon ausgehen, dass die Bakterien einem deutlich höheren Stress durch das Zentrifugieren ausgesetzt sind, was die mit Farbstoff inkubierten Bakterien anfälliger für die PIB macht. Schäden der bakteriellen Oberfläche durch Zentrifugalkraft scheinen deutlich größer zu sein als allgemein angenommen [116]. Dies zeigt sich in dieser deutlichen Keimreduktion im Vergleich zu den Versuchen ohne Waschen. Die Lichtkontrollen zeigen keinerlei Keimreduktion, was dafür spricht, dass ausschließlich die Kombination aus dem Stress des Waschvorgangs und aus der nachfolgenden Bestrahlung durch die Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies zum Absterben der Bakterien führte. Für den Fall, dass sich die Farbstoffe lediglich an die Bakterien anlagern und nicht von ihnen aufgenommen werden, würde das Zentrifugieren den Farbstoff und die Keime deutlich näher bringen, was einen zusätzlichen phototoxischen Effekt mit sich bringen könnte. Zur Verifizierung wäre es interessant, das Penetrationsverhalten der neuen Farbstoffe zu untersuchen. Hierzu zeigen erste parallel durchgeführte Experimente der Arbeitsgruppe, dass man mittels hochsensitiver

Fluoreszenzmikroskopie in Echtzeit die Aufnahme von Photosensibilisatoren in *S. aureus* während der photodynamischen Reaktion beobachten kann, um somit die Lokalisation der PS zu detektieren (Manuskript eingereicht, [117]).

Eine weitere Möglichkeit für die deutliche Verbesserung der Ergebnisse bei den Experimenten mit Waschprozedur könnte die Verminderung des sogenannten „Shielding“ Effekts des Farbstoffs sein. Das bedeutet, dass durch die eigene Färbung des Farbstoffs bei hohen Konzentrationen das Licht aus der Lichtquelle „abgeschirmt“ wird und somit eine schlechtere Aktivierung der Photosensibilisatoren erfolgen würde. Durch die Waschprozedur wird der Farbstoff verdünnt. Infolgedessen können über eine bessere Transmission des Lichts in der Suspension mehr Farbstoffmoleküle aktiviert werden und dadurch besser wirken.

4.2 PHOTOTOXIZITÄTSTESTS *EX VIVO*

Das Robert Koch-Institut empfiehlt zur Dekolonisierung von MRSA nach erfolgtem positiven Nachweis durch ein Screening von Prädilektionsstellen (Nasenvorhöfe, Rachen, eventuell vorhandene Wunden sowie an der Leiste und gegebenenfalls am Perineum) zunächst die Unterbringung in einem Einzelzimmer bzw. eine Kohortierung der betroffenen Patienten [118]. Das behandelnde Ärzte- und Pflegeteam ist dazu angehalten, zusätzlich zur intensiven Händehygiene Schutzkleidung zu tragen. Die Dekolonisierung des Patienten hat das Ziel, eine Infektion des Patienten mit diesem Isolat sowie eine Weitergabe des MRSA-Isolats zu verhindern. Zur nasalen Dekolonisierung wird meistens eine Muciprocin-Behandlung über fünf Tage durchgeführt [118]. Bei Muciprocin handelt es sich um das am besten untersuchte topische Antibiotikum. Die orale Dekolonisierung wird mit Antiseptika, wie Octenidin oder Chlorhexidin in Form von Gurgeln oder Spülen erreicht. Die Dekolonisierung der Haut wird ebenfalls mittels Antiseptika über mehrere Tage durchgeführt. Zur Kontrolle müssen nach erfolgter Dekolonisierung nochmals Abstriche genommen werden. Diese müssen an drei verschiedenen Tagen negativ gewesen sein [118].

Dieses sehr aufwändige Eradizierungsschema für MRSA könnte durch die Photodynamische Inaktivierung von MRSA unterstützt werden. Im Rahmen der *in vitro* Experimente konnte gezeigt werden, dass der Antibiotika-resistente *Staphylococcus aureus* mittels Photodynamik ebenso gut eradiziert wird, wie der Antibiotika-sensible *S. aureus*. Um eine zukünftige klinische Anwendung dieser Methode zur Dekolonisierung von MRSA im Krankenhausalltag zu erproben, sind *ex vivo* Hautmodelle vonnöten, die gleiche Eigenschaften wie menschliche Haut zeigen. Eine Toxizität der neuen Porphyrin-Derivate TPyP 8+A sowie 8+B ist aufgrund der neuen funktionellen Gruppen nicht sicher auszuschließen, da die hierzu notwendigen Untersuchungen zur Lokalisation der Farbstoffe sowie *in vitro* Versuche mit menschlichen Hautzellen noch fehlen. Aus diesem Grunde hat die photodynamische Arbeitsgruppe des Universitätsklinikums Regensburg bereits mit Erfolg ein *ex vivo* Schweinehautmodell etabliert: Maisch *et al.* konnten mit dem Porphyrin-Derivat XF73 das Wachstum der Keime MRSA sowie *S. aureus* um 3 log₁₀-Stufen reduzieren. Histologische Untersuchungen der Schweinehaut nach der Bestrahlung zeigten vitale Hautzellen ohne Schäden. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass XF73 wie auch TPyP sich lediglich an das Stratum corneum anlagerten, ohne in die tieferen Hautschichten zu penetrieren [96]. Dies ist ein Sicherheitsaspekt bezüglich der Applikation dieses PS auf intakter Haut. Zuvor wurde in einer anderen Arbeit das *ex vivo* Schweinehautmodell als

solches in dieser Arbeitsgruppe für die Optimierung des Prozedere bei der photodynamischen Therapie von Hautkrebs und aktinischer Keratose erforscht. Unter anderem konnte die Vitalität der Schweinehaut über einen Zeitraum von 24 h nach der Aufbewahrung in HEPES – Agar nachgewiesen werden. Der HEPES – Agar versorgt die Hautzellen mit Nährstoffen und bildet eine Feuchtkammer um diese. Entsprechend wurde die Schweinehaut auch in dieser Arbeit behandelt [102].

Bei allen drei untersuchten Photosensibilisatoren zeigte sich eine Keimreduktion bei den Experimenten mit dem *ex vivo* Schweinehautmodell. Es wurden im Rahmen der *ex vivo* Versuche nur *E. coli* und *S. aureus* untersucht. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die zur Verfügung stehende Schweinehaut aufgrund der Größe nur eine begrenzte Anzahl an präparierten Hautstücken zuließ. Die vorangegangenen *in vitro* Versuche zeigten allerdings gleiche Ergebnisse bei *S. aureus* und MRSA sowie bei *E. coli* und CIP, weswegen man davon ausgehen kann, dass die Keime auf der Haut ebenso eine gleiche Empfindlichkeit gegenüber der PIB aufweisen. Im Gegensatz zu den *in vitro* Experimenten zeigten sich allerdings inkonstantere Ergebnisse in Hinblick auf die erreichte log₁₀-Stufenreduktion der Keime, was auf verschiedene Gründe zurückzuführen ist.

Bei TMPyP wurde mit *E. coli* bei allen Konzentrationen des Farbstoffs eine Keimreduktion von 4 log₁₀-Stufen erreicht, was einer Reduktion von 99.99 % entspricht. Dadurch ist definitionsgemäß keine Desinfektion erreicht worden. Es kann jedoch konstatiert werden, dass eine ausreichende antimikrobielle Wirkung der Photodynamik erzielt wurde. Bei *S. aureus* erfolgte mit 5 µM TMPyP eine Keimreduktion um über 7 log₁₀-Stufen, jedoch mit einer großen Varianz der einzelnen Ergebnisse. Dies kann an den nachfolgend genannten Problemen gelegen haben, sodass die einzelnen unabhängigen Experimente Ergebnisse mit größerer Varianz aufzeigten.

Bei den Versuchen mit TPyP 8+A am *ex vivo* Schweinehautmodell wurde bei *E. coli* mit 5 µM des Farbstoffs eine 5 log₁₀-Stufenreduktion der Keime erreicht, womit eine desinfizierende Wirkung erreicht wurde. Die Dunkelkontrolle zeigt eine Dunkeltoxizität mit einer Keimreduktion um 99.99 %. Die *in vitro* Versuche zeigten zunächst ebenfalls mit *E. coli* teilweise eine Dunkeltoxizität (siehe **Abb. 9.5, 9.11** sowie **9.17, Kapitel 9.2**), welche bei Versuchswiederholungen im Rahmen einer Dunkelkontrollreihe unter strengeren Bedingungen bezüglich des Lichts nicht beobachtet wurden (siehe **Abb. 3.7, Kapitel 3.1.4**). Dies kann entsprechend der *in vitro* Versuche entweder an einer zu hohen Lichtexposition zwischen den Arbeitsschritten gelegen haben oder am Keim selbst. Interessanterweise zeigte sich vornehmlich bei *E. coli* eine Dunkeltoxizität. Bei *S. aureus* andererseits wurde mit

TPyP 8+A eine Keimreduktion von 7 \log_{10} -Stufen erreicht, hier zeigte sich wiederum keine Dunkeltoxizität.

Bei TPyP 8+B zeigte sich bei der Lichtkontrolle mit *E. coli* eine Keimreduktion. Da *E. coli* bei den Farbstoffen TPyP und TPyP 8+A ein normales Wachstum bei den Lichtkontrollen aufwies und sich auch bei *S. aureus* bei allen drei Farbstoffen nie eine Keimreduktion bei Lichtkontrollen zeigte, scheint dies eher auf einen Fehler der Versuchsdurchführung zurückzuführen sein. Bei Inkubation mit dem Farbstoff wurde eine Bakterienreduktion von einer \log_{10} -Stufe erreicht. Bei *S. aureus* hingegen wurde mit 5 μM eine Keimreduktion von 6.7 \log_{10} -Stufen erzielt.

Insgesamt wäre es bei den Schweinehautversuchen von Vorteil, diese Versuche häufiger als drei Mal durchzuführen, um eine ausreichende Stichprobenanzahl zu erhalten.

Die kompliziertere Versuchsdurchführung als bei den *in vitro* Experimenten könnte die Unterschiede in den Ergebnissen begründen: Die Verteilung der Bakterientropfen sowie des Farbstoffs konnte aufgrund der unebenen Beschaffenheit der Schweinehaut nicht exakt aufeinander abgestimmt werden. Zum Teil verlief der Tropfen, welcher die Bakterien enthielt, in verschiedene Richtungen und verteilte sich nicht exakt im Zentrum des Hautstücks, wie es normalerweise der Fall war. Das gleiche konnte entsprechend auch mit dem später hinzugefügten Farbstoff passieren. Dadurch ergaben sich wahrscheinlich teilweise kleine Areale, auf denen sich nur Bakterien oder nur Farbstoff befanden. Demzufolge konnte nicht sichergestellt werden, dass tatsächlich alle Keime abgetötet wurden, da Bakterien in manchen Arealen eventuell gar keinen Kontakt zum Farbstoff hatten. In Zukunft wäre es möglich, diese Fehlerquelle zu minimieren, indem jeweils das komplette Hautstück gleichmäßig mit der Bakteriensuspension und anschließend mit der Farbstofflösung bestrichen werden würde. Somit könnte ein „Verlaufen“ der Bakterien- und Farbstofftropfen vermieden werden.

Ein weiterer Unsicherheitsfaktor war die Tatsache, dass sich während der 30-minütigen Bestrahlungszeit die Schweinehautstücke um 10°C erwärmten, was mithilfe eines Infrarotthermometers gemessen wurde. Diese Erwärmung schien jedoch keinen toxischen Effekt durch thermische Schäden auf die Bakterien gehabt zu haben, da die jeweiligen Lichtkontrollen (Bestrahlung der Bakterien ohne vorherige Inkubation mit einem Farbstoff) keine Reduktion der Keime zeigte, außer bei TPyP 8+B (siehe oben). Ein weiterer Punkt, der die Wiederfindungsrate der aufgetragenen Bakterien auf der Haut erschwerte, ist Folgender: Nach der Bestrahlung waren die jeweiligen Farbstoffe auf den Hautstücken eingetrocknet, was die Rückgewinnung der Bakterien mit den sterilen Wattebäuschen und

die Überführung in das Reaktionsgefäß erschwerte und zu Ungenauigkeiten geführt haben könnte. Zudem ist es möglich, dass nicht alle Bakterien mit dem Wattebausch aufgenommen wurden oder sich nicht vom Wattebausch gelöst haben. In diesem Protokoll wurden dreimal hintereinander die Wattebausche mit leichtem Druck über die Hautstücke gewischt, um die Bakterien abzutragen. Anschließend wurden sie in Müller – Hinton Bouillon ausgewrungen. Maisch *et al.* untersuchten bereits die Effektivität der Bakterienrückgewinnung in Hinblick auf die Anzahl der Abtragungsvorgänge. Nach nur einem Durchgang Wischen und Auswringen konnten lediglich 24.3 ± 1.2 % der Bakterien zurückgewonnen werden. Nach dreimaligem Wiederholen, wie auch in dieser Arbeit, konnten jedoch durchschnittlich 89 ± 4.5 % der Bakterien zurückgewonnen werden [96]. Es stellt sich die Frage, ob man dieses Ergebnis durch vier- oder fünfmaliges Wiederholen verbessern kann.

Eine weitere Problematik hinsichtlich der Schweinehaut demonstriert die Arbeit von Messenger *et al.*: Hier konnte gezeigt werden, dass bakterielle Pathogene auf menschlichen *ex vivo* Hautmodellen über mehrere Tage überleben und wachsen können. Zudem haben sie die Fähigkeit, das Stratum corneum zu penetrieren [119]. Dies bringt eine weitere Schwierigkeit für eine erfolgreiche Desinfektion mit ins Spiel: Es muss gewährleistet sein, dass die Farbstoffe überall dort hinkommen können, wo sich Keime befinden, ohne jedoch die Hautschichten zu penetrieren. Um eine bessere Verteilung des Farbstoffs auf der unebenen Hautoberfläche zu gewährleisten, könnte ein möglicher Ansatz für die Zukunft die Erforschung unterschiedlicher Formulierungen sein. Ziel wäre es, durch eine gute Aufnahme der Cremes oder Salben in die Haut, die Photosensibilisatoren überall auf der Haut bis in die kleinsten Falten zu verteilen. In einer Arbeit dieser Arbeitsgruppe wurden bereits unterschiedliche Formulierungen und Salben mit ihrem jeweiligen Penetrationsverhalten miteinander verglichen. Das Penetrationsverhalten des getesteten Farbstoffs wurde unter anderem in einem hydrophilen Gel mit und ohne Absorptionsverstärker, in einer Fettcreme, einer hydrophilen Creme und verschiedenen Formulierungen aus der Industrie verglichen. Das beste Aufnahmeverhalten zeigte eine Wasser-Ethanol-Formulierung [101]. Analog dazu wäre es sinnvoll, eine Formulierung für die beste Verteilung, nicht jedoch Penetration, der in dieser Arbeit untersuchten Photosensibilisatoren auf dem Stratum corneum zu finden.

Für den klinischen Einsatz ist zudem eine Testung der Hautverträglichkeit der drei untersuchten Photosensibilisatoren sehr wichtig. Dies wurde mit TMPyP bereits untersucht: Eichner *et al.* überprüften die Toxizität der PIB mit TMPyP an humanen Keratinozyten. Nach einer Inkubation mit $10 \mu\text{M}$ TMPyP und der gleichen Bestrahlungszeit von 10 s, wie sie auch in dieser Arbeit gewählt wurde, zeigte sich ein Überleben von 77.2 % der Zellen. Somit hatte die PIB nur einen geringen Einfluss auf die Hautzellen. Unter gleichen Bedingungen konnten

wiederum 99.999 % der Bakterien abgetötet werden. Zudem zeigte sich fluoreszenzmikroskopisch ebenfalls an einem *ex vivo* Schweinehautmodell, dass sich TMPyP nur an das Stratum corneum, die oberste biologisch tote Hautschicht anlagerte. Dies spricht für ein vorhandenes „therapeutisches Fenster“ für den Einsatz der PIB gegen Bakterien. Auch bei Lambrechts *et al.* wurde die Toxizität der PIB, jedoch anhand anderer menschlicher Hautzellen, den Fibroblasten getestet. Diese wurden mit Konzentrationen eines kationischen Porphyrins inkubiert, welche sich bekanntermaßen als tödlich für humanpathogene Keime herausgestellt hatten, und anschließend bestrahlt. Die Konzentrationen, mit denen *S. aureus* inaktiviert werden konnte, unterschritten deutlich die Konzentration, welche sich toxisch auf die menschlichen Fibroblasten auswirkte [120]. Ebenso konstatierten Grinholc *et al.*, dass die PIB mit einer Inaktivierung von 22.5 % der Fibroblasten nur einen geringen Effekt auf das Überleben humaner Zellen hätte. Sie untersuchten die Eradizierung von *S. aureus* mit dem kationischen Porphyrin Protoporphyrin Diarginat [121]. Diese Versuche müssten mit den zwei neuen TMPyP-Derivaten TPpP 8+A und 8+B wiederholt werden, um sicherzustellen, dass sich auch bei diesen Farbstoffen ein therapeutisches Fenster zur Eradizierung dieser Keime präsentiert.

Insgesamt wäre für die Photodynamik ein synergistischer Einsatz zusammen mit Antibiotika für den klinischen Einsatz denkbar, da sie nur topisch auf Oberflächen, Haut und Schleimhaut eingesetzt werden, nicht jedoch systemisch. Ein Anwendungsgebiet wäre die Prävention einer Infektion bzw. einer Übertragung von Keimen durch Oberflächen- und Händedesinfektion. Dies hätte den Vorteil, dass Viren und Sporen, welche durch die gängigen Desinfektionsmittel nicht mit abgedeckt werden, ebenfalls durch das photodynamische Prinzip eradiziert werden könnten [122]. Andererseits wäre die Abtötung von Keimen auf der Haut ein mögliches klinisches Einsatzgebiet, wie beispielsweise bei der oben beschriebenen Dekolonisierung von MRSA im Nasenrachenraum oder bei superinfizierter Wunden. Erste Untersuchungen am Tiermodell zeigten bereits Erfolge [123, 124]. Des Weiteren wurde von Morley *et al.* bereits eine erste klinische Studie am Menschen zur Eradizierung von Bakterien auf chronischen Ulzera mit vielversprechenden Ergebnissen durchgeführt [125]. Die Behandlung wurde sehr gut und ohne Schmerzen vertragen. Direkt nach der Behandlung zeigte sich bereits eine Reduktion der Keimlast ($P < 0.001$). Nach drei Monaten waren die chronischen Ulzera von 50 % (4 von 8) der photodynamisch behandelten Patienten abgeheilt; in der Placebo-Gruppe waren es lediglich 12 %. In Zukunft soll diese Studie mit einer größeren Teilnehmerzahl wiederholt werden [125].

Für eine topische Anwendung müssten somit keine systemisch wirksamen Antibiotika mehr eingesetzt werden, wodurch Resistenzbildungen eingedämmt werden könnten.

Eine Verbesserung für die Zukunft wäre eine Verkürzung der Inkubations- und Bestrahlungszeit hinsichtlich einer Anwendbarkeit im klinischen Alltag wie auch bei den *in vitro* Versuchen. Für den Krankenhausalltag ist es sinnvoll, ein Protokoll zu etablieren, welches eine möglichst kurze Inkubations- und auch Bestrahlungszeit beinhaltet, um eine Wartezeit durch eine lange Einwirkzeit zu vermeiden. Je einfacher die Durchführung, desto höher ist die Compliance für die Anwendung.

4.3 RESISTENZENTWICKLUNG gegenüber der PIB

Aufgrund der steigenden Resistenzentwicklung von Bakterien gegen die gängigen Antibiotika stellt sich die Frage, ob humanpathogene Erreger auch gegen die photodynamische Inaktivierung von Bakterien mit den hier untersuchten Porphyrin-Derivaten Resistenzen entwickeln könnten. Dies käme durch verschiedene Mechanismen in Frage. Die in dieser Arbeit untersuchten PS sind positiv geladen, was zu einer besseren Adhäsion des Farbstoffs an die Zellwand der Keime führt. Gram-negative Bakterien haben bei anderen antimikrobiellen Substanzen bereits Wege gefunden, die Struktur ihrer negativ geladenen Zellwand zu verändern und so die negative Ladung zu reduzieren [126, 127]. Dies könnte in einem zweiten Schritt zu einer schlechteren Anlagerung des PS an die Zellmembran der Bakterien und somit zu einer Unterschreitung der wirksamen Konzentration führen. Auch Gram-positive Bakterien können ihre Zellwandstruktur verändern, indem es zum Beispiel zu einer engmaschigeren Verknüpfung der Peptidoglykane kommt [128]. Dies könnte zu einer verminderten Anlagerung oder Penetration des Farbstoffs führen. Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit versucht, die photodynamische Effektivität eines bereits bekannten PS, des Porphyrins TMPyP, durch eine höhere positive Ladungszahl zu verbessern, da wie oben erwähnt, Bakterien bereits Möglichkeiten gefunden haben, die negative Ladungsoberflächenverteilung zu reduzieren. Dies geschieht beispielsweise durch die Modifikation von Lipopolysacchariden auf der Zelloberfläche der Keime, wie Richards *et al.* in ihrer Arbeit beschreiben. *Salmonella enterica* sind somit in der Lage, über Regulation ihrer Genexpression den Immunmechanismen des Wirts auszuweichen [126]. Ein weiterer Mechanismus ist die von Gruenheid *et al.* beschriebene Entwicklung von Resistenzen gegen antimikrobielle Peptide, welche in den meisten Organismen als Teil des Immunsystems vorhanden sind [127].

Eine andere Möglichkeit zur Resistenzentwicklung wäre die Entwicklung eines Mechanismus gegen die Produkte (hier: ROS) der Photodynamik. Der angeregte Photosensibilisator gibt seine Energie entweder über die Typ I-Reaktion mit Bildung von Sauerstoffradikalen oder über die Typ II-Reaktion mit Bildung von Singulett-Sauerstoff ab. Es hat sich bereits gezeigt, dass Bakterien in der Lage sind, Enzyme wie die Superoxiddismutase (SOD) zu bilden. Diese könnten Sauerstoffradikale abbauen, die durch die Typ I-Reaktion entstehen. Nakonieczna *et al.* konnten zeigen, dass eine erhöhte intrinsische Aktivität der SOD in *S. aureus* mit einer verminderten Anfälligkeit für die PIB einhergeht. Mit längeren Inkubationszeiten und höheren Lichtdosen konnten jedoch selbst

die Bakterien mit erhöhter SOD eradiziert werden. Dies zeigt, dass keine richtige Resistenz, sondern lediglich eine verminderte Empfindlichkeit bei manchen Bakterienspezies gegen die Photodynamische Inaktivierung vorliegt [129]. Grinholc *et al.* konnten zeigen, dass die Inaktivierung von Methicillin-sensiblen *S. aureus* (MSSA) und MRSA mit dem Photosensibilisator Protoporphyrin-Diarginat Stamm-abhängig ist. Es wurden je 40 verschiedene MSSA- und MRSA-Isolate auf ihre Empfindlichkeit für die PIB untersucht. Es zeigte sich, dass Stämme, welche zur Biofilm-Produktion befähigt waren, weniger empfindlich auf die PIB reagierten. Es konnte jedoch keine Korrelation zwischen der Resistenz zur PIB und einem Antibiotika-Resistenzmuster gefunden werden [130]. Es wurde zudem kein Versuch unternommen, die „resistenten Keime“ mit längeren Inkubationszeiten oder höheren Dosen analog zu Nakonieczna *et al.* in einem zweiten Schritt letzten Endes zu eradizieren. Somit ist bisher keine Aussage darüber möglich, ob eine echte Resistenz vorlag oder nicht. Cieplik *et al.* dagegen konnten zeigen, dass Biofilm-produzierende Bakterien mit dem Farbstoff SAPYR, ein ausschließlich Typ-II reagierender PS (Singulett-Sauerstoff), nach Lichtaktivierung erfolgreich abgetötet werden können [66]. Somit wäre es interessant, die Keime, welche sich bei Grinholc *et al.* als resistent aufwiesen, nochmals mit Photosensibilisatoren (vorrangig der Typ-II Reaktion) zu behandeln, welche eine Wirksamkeit gegen Biofilme bewiesen haben, um eine umfassendere Aussage zur Resistenz gegen die Photodynamische Inaktivierung zu treffen.

Die hier erstmals untersuchten Photosensibilisatoren TPyP 8+A und TPyP 8+B sowie der Referenzphotosensibilisator TMPyP zeichnen sich alle durch eine hohe Quantenausbeute bezüglich Singulett-Sauerstoff aus, was vornehmlich für die Typ II-Reaktion mit Bildung von Singulett-Sauerstoff einhergeht [93]. Dieser ist chemisch gesehen wie molekularer Sauerstoff im Triplett-Grundzustand, jedoch im Singulett-Zustand. Insofern scheint es unwahrscheinlich, dass die in dieser Arbeit untersuchten Keime eine Resistenz gegen den für sie notwendigen Sauerstoff entwickeln könnten. Tavares *et al.* haben in ihrer Arbeit bereits eine potenzielle Resistenzentwicklung von *Escherichia coli* und *Vibrio fischeri* gegen ein kationisches Porphyrin untersucht. Dieser PS war im Gegensatz zu den drei in dieser Arbeit gebrauchten Farbstoffen dreifach positiv geladen. Nach jeder Bestrahlung wurden überlebende Bakterienkolonien erneut bestrahlt. Nach zehn Generationen von Bakterien, die in dieser Form behandelt wurden, zeigte sich keinerlei Resistenzentwicklung [131]. Diese Tatsache und die Tatsache, dass es sich bei der Photodynamik um eine unspezifische Oxidation von Zellbestandteilen handelt, im Gegensatz zum Schlüssel-Schloss-Prinzip der Antibiotika, macht eine mögliche Resistenzentwicklung gegen die PIB momentan unwahrscheinlich.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Durch eine zunehmende Entwicklung von Resistenzen gegen die gängigen Antibiotika sowie ein deutlicher Rückgang neu zugelassener Antibiotika muss nach neuen Alternativen zur Bekämpfung der Keime gesucht werden. Die photodynamische Inaktivierung von Bakterien (PIB) stellt eine vielversprechende Alternative zur Desinfektion von Oberflächen, Haut und Schleimhäuten dar. Bei der PIB werden durch Zusammenwirkung eines photoaktiven Farbstoffs, dem Photosensibilisator, und Licht reaktive Sauerstoffspezies erzeugt, welche unspezifisch humanpathogene Keime, wie Bakterien, Pilze oder Viren abtöten. In dieser Arbeit wurde in zwei Teilen einerseits durch Experimente *in vitro* sowie andererseits *ex vivo* am Schweinehautmodell die photodynamische Wirksamkeit von zwei neuen TMPyP-Derivaten untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde TMPyP, ein kationischer PS aus der Gruppe der Porphyrine, der bereits erfolgreich in der PIB eingesetzt wurde, mit zwei von der Arbeitsgruppe in Kooperation mit dem Institut für Organische Chemie der Universität Regensburg neu synthetisierten TMPyP-Derivaten (TPyP 8+A sowie TPyP 8+B) verglichen. Die neuen Derivate tragen acht positive Ladungen an ihren funktionellen Gruppen, statt vier wie TMPyP. Ziel des ersten Teils war es zu untersuchen, ob mit den neuen Derivaten eine Wirkoptimierung zur Eradizierung von Gram-positiven (*S. aureus* und MRSA) sowie Gram-negativen Keimen (*E. coli* und CIP) im Vergleich mit TMPyP bei einer Bestrahlungszeit von nur 10 s erzielt werden konnte. Bei den Ergebnissen der *in vitro* Suspensionsexperimente zeigte sich bei einer Inkubationszeit von 30 s eine Verbesserung der antibakteriellen photodynamischen Wirkung der zwei neuen PS gegenüber TMPyP. Bei Letzterem zeigte sich bei 5 μM des PS eine Keimreduktion um über 5 \log_{10} -Stufen, was der Definition der Desinfektion entspricht [104]. Diese Wirkung wurde bei TPyP 8+A sowie 8+B bereits mit 2.5 μM des jeweiligen PS erreicht. Bei einer Inkubationszeit von 10 min sowie 60 min zeigte sich kein Unterschied zwischen den neuen PS und dem Referenzfarbstoff mit allen vier untersuchten Keimen. Dies zeigt, dass bei einer kurzen Inkubationszeit die höhere positive Ladung der neuen PS einen Vorteil gegenüber TMPyP hat. Die *in vitro* Experimente wurden noch mal mit einer vorangehenden Waschprozedur durchgeführt, um zu überprüfen ob sich die Photosensibilisatoren an Bakterien anlagern bzw. aufgenommen werden. Die Waschexperimente zeigten, dass eine ausreichende Menge an Photosensibilisatormolekülen sich an die Bakterien anlagern bzw. aufgenommen wurden und somit eine photodynamische

Inaktivierung der Bakterien bewirkten. Dies war abhängig von der Anzahl der positiven Ladungen.

In einem zweiten Schritt wurden die neuen PS an einem *ex vivo* Schweinehautmodell mit TMPyP verglichen. Hier zeigte sich eine photodynamische Keimreduktion bei *S. aureus* sowie *E. coli*, dennoch konnte eine Reduktion $> 5 \log_{10}$ -Stufen (Desinfektion) nicht immer erzielt werden.

Dem ungeachtet konnte man mit diesen Experimenten auf lebender Haut den erfolgsversprechenden Einsatz der PIB für die Dekolonisierung von MRSA im Nasenrachenraum oder zur Eradizierung von Keimen auf superinfizierten Wunden mit TMPyP und den neuen Derivaten demonstrieren.

6 AUSBLICK

Die Einsatzmöglichkeiten des photodynamischen Prozesses sind vielfältig. Einerseits könnte sie die hygienische und chirurgische Händedesinfektion in Krankenhäusern ersetzen; Eichner *et al.* zeigten, dass multiresistente Bakterien und auch Pilze innerhalb von Sekunden mittels PIB abgetötet werden können [88]. Andererseits konnten auch schon bakterielle Biofilme, die besonders hartnäckig und mit Antibiotika äußerst schwer zu therapieren sind erfolgreich mittels Photodynamischer Inaktivierung eradiziert werden [66]. Cieplik *et al.* sowie de Melo *et al.* untersuchten erfolgreich die Möglichkeit der PIB für die Eradizierung von Biofilmen, vor allem für den Einsatz in der Zahnheilkunde [66, 132]. Superinfizierte chronischen Wunden konnten ebenfalls bereits mit sehr guten Ergebnissen mithilfe der Photodynamik von Keimen befreit werden [125].

Ein großer Faktor für die Weitergabe multiresistenter Keime sind auch unbelebte Vektoren, z.B. Arbeitsflächen in Krankenhäusern oder diagnostische Arbeitsgeräte, z.B. Gastroskope oder Bronchoskope. Ein vielversprechender Ansatz für die Herstellung selbstdesinfizierender Oberflächen ist auch in diesem Fall die Photodynamische Inaktivierung. Durch dieses Verfahren kann die Anzahl der Keime auf Arbeitsflächen niedrig gehalten werden und die Weiterverbreitung von Krankenhausregern vermindert werden [133, 134].

Ein weiteres Einsatzgebiet der PIB könnte die Desinfektion von Krankenhausabwässern werden, die die führende Quelle für multiresistente Keime darstellen, die in die Umwelt abgeleitet werden. Almeida *et al.* untersuchten die Möglichkeit, rückständige multiresistente Keime aus dem Abwasser von Krankenhäusern mithilfe der PIB abzutöten, da sich bisherige Methoden oftmals als teuer und ineffizient erwiesen [135].

Die in dieser Arbeit untersuchten Photosensibilisatoren haben im Schweinehautmodell gezeigt, dass sie Potenzial für eine zukünftige klinische Anwendung haben: Eine Fortführung und Weiterentwicklung der Schweinehautexperimente in Hinblick auf die Dekolonisierung von MRSA wäre sinnvoll. Es wäre zudem wichtig, die Hautverträglichkeit der Farbstoffe mit Hilfe von Versuchen zur Aufnahme der Farbstoffe zu überprüfen. Des Weiteren wäre es interessant, die neuen TMPyP-Derivate auf ihre Effektivität zur Inaktivierung von Biofilmen und Sporen zu untersuchen, da sie mit ihrer hohen positiven Ladung stark an den Bakterien haften und somit das Potenzial hätten, auch hartnäckige Biofilme zu eradizieren.

Für die Synthese einer weiterentwickelten Generation wäre die Erhöhung der positiven Ladungen über acht nicht mehr sinnvoll. Der Syntheseaufwand würde bei Weitem den Nutzen übersteigen. Es wäre jedoch möglich, eine der vier funktionellen Gruppen der zwei untersuchten Derivate durch eine Alkylkette zu ersetzen. Diese könnte sich durch ihren lipophilen Charakter in die Membran der Bakterien einlagern und somit eine stärkere Anheftung an die Keime hervorrufen, was auch im Hinblick auf eine Eradizierung von Biofilmen und Sporen von Vorteil wäre. Es wäre außerdem möglich, eine der vier Pyridingruppen von TMPyP durch drei aneinander gekoppelte Aminosäuren mit je einer positiven Ladung, wie Lysin zu ersetzen. Diese asymmetrische Anordnung der Ladungen könnte ebenfalls zu einer Wirkoptimierung führen.

Die Photodynamische Inaktivierung von Bakterien stellt somit eine Bandbreite an Möglichkeiten zur Bekämpfung multiresistenter Keime dar und ist ein vielversprechender Ansatz für den klinischen Einsatz in der Zukunft.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<	kleiner
>	größer
≥	größer gleich
±	plus minus
%	Prozent
°C	Grad Celsius
3°	3. Generation
β	beta
λ	lambda, Emissionsspektrum
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
μmol	Mikromolar
A	Flächeninhalt [<i>engl.</i> acre]
Abb.	Abbildung
BZ	Bestrahlungszeit
CDC	Centers for Disease Control and Prevention (<i>engl.</i>)
CFU	Kolonie bildende Einheiten [<i>engl.</i> colony forming units]
CIP	Ciprofloxacin-resistenter <i>Escherichia coli</i>
cm	Zentimeter
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
EHEC	enterhämorrhagischer <i>Escherichia coli</i>
ESBL	Extended Spectrum β-Lactamase
E(t)	Verweilzeit
<i>et al.</i>	et alii [<i>lat.</i> und andere]

g	Gramm
g/l	Gramm pro Liter
g mol ⁻¹	Gramm pro Mol
HO·	Hydroxylradikal
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
I	intermediär
IZ	Inkubationszeit
J	Joule
J cm ⁻²	Joule pro Quadratzentimeter
KISS	Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System
log ₁₀	Logstufe des dekadischen Logarithmus
MD	Medical Doctor (<i>engl.</i>)
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minute
ml	Milliliter
ml ⁻¹	pro Milliliter
MPH	Master of Public Health (<i>engl.</i>)
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
MW	Molekularmasse [<i>engl.</i> molecular weight]
mW cm ⁻²	Milliwatt pro Quadratzentimeter
nm	Nanometer
NRZ	Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen
O ₂	molekularer Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxidanion
¹ O ₂	Singulett-Sauerstoff
³ O ₂	Triplett-Zustand des Sauerstoffs
OD	optische Dichte

P	Leistung [<i>engl.</i> power]
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung [<i>engl.</i> phosphate buffered saline]
PDT	photodynamische Therapie
PIB	photodynamische Inaktivierung von Bakterien
PS	Photosensibilisator
R	resistant
ROS	reaktive Sauerstoffspezies [<i>engl.</i> reactive oxygen species]
rpm	Umdrehungen pro Minute [<i>engl.</i> rounds per minute]
S	sensibel
s	Sekunde
S ₀	Grundzustand
S ₁ -Zustand	erster angeregter Zustand
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
t	Zeit [<i>engl.</i> time]
T ₁	Triplett-Zustand
Tab.	Tabelle
TMPyP	5,10,15,20-Tetrakis(1-methyl-4-pyridinio) – porphyrin tetra(p-toluenesulfonate)
TPyP 8+A	5,10,15,20-tetrakis(N-(3-N,N,N-triethylaminium-propyl)-4-pyridyl)-21H,23H- porphyrin-octachloride
TPyP 8+B	5,10,15,20-tetrakis(N-(3-(N-pyridinium)propyl)-4-pyridyl)-21H,23H-porphyrin-octachloride
v. Chr.	vor Christus
VRE	Vancomycin-resistenten Enterokokken
WHO	Weltgesundheitsorganisation [<i>engl.</i> World Health Organization]
ZVK	zentraler Venenkatheter

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Fleming, A., *On the antibacterial action of cultures of a Penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae*. British Jour Exp Path, 1929. **10**((3)): p. 226-236.
2. Abraham, E.P., et al., *Further observations on penicillin*. 1941. European journal of clinical pharmacology, 1992. **42**(1): p. 3-9.
3. CDC, *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013*, in CDC Report.
4. Howell, L.e.a., *Global Risks 2013*. World Economic Forum, 2013: p. 80.
5. G7 Gipfel, -J.S.E., *Abschluss Erklärung G7 Gipfel, 7.-8. Juni 2015*. 2015.
6. Statement, W.H., *The National Action Plan for Combating Antibiotic-Resistant Bacteria*. 2015.
7. Darwin, C. and J.W. Burrow, *THE ORIGIN OF SPECIES BY MEANS OF NATURAL SELECTION OR THE PRESERVATION OF FAVORED RACES IN THE STRUGGLE FOR LIFE BOOK*. The Origin of Species by Means of Natural Selection or the Preservation of Favored Races in the Struggle for Life Book 1968.
8. Paulsen, I.T., et al., *Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant Enterococcus faecalis*. Science, 2003. **299**(5615): p. 2071-2074.
9. Microbiology, A.A.o., *ANTIBIOTIC RESISTANCE: An ecological perspective on an old problem*, 2009.
10. Kapil, A., *The challenge of antibiotic resistance: Need to contemplate*. Indian Journal of Medical Research, 2005. **121**(2): p. 83-91.
11. Kumar, A. and H.P. Schweizer, *Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2005. **57**(10): p. 1486-1513.
12. www.bundesgesundheitsministerium.de, *DART - Deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie*, 2011.
13. Cain, C., *Rediscovering antibiotics*. SciBX 5(46), 2012.
14. Spellberg, B., et al., *The Epidemic of Antibiotic-Resistant Infections: A Call to Action for the Medical Community from the Infectious Diseases Society of America*. Clin. Infect. Dis. 46, 155–164, 2008.
15. CDC, *Definitionen nosokomialer Infektionen (CDC-Definitionen)*. Robert Koch-Institut, 2011.
16. Geffers, C., *Nosocomial Infections and Multidrug-resistant Organisms in Germany: Epidemiological Data From KISS (The Hospital Infection Surveillance System) Reply*. Deutsches Arzteblatt International, 2011. **108**(18): p. 320-320.
17. RKI, *Europäischer Antibiotiktag 2011 - Antibiotikaresistenz und nosokomiale Infektionen*. Epidemiologisches Bulletin 45/2011, 2011.
18. EARS-Net, *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013*. 2013.
19. EARS-Net, *Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe*, 2011.
20. Norrby, S., *Emerging antibiotic resistance in gram positive bacteria: return to the pre-antibiotic era?* Hong Kong Med J 1995;1:129-35.
21. Melo-Cristino, J., et al., *First case of infection with vancomycin-resistant Staphylococcus aureus in Europe*. The Lancet. **382**(9888): p. 205.
22. Wagenvoort, J., *Dutch measures to control MRSA and the expanding European Union*. Euro Surveill. 2000, 2000. **5**(3): p. 31.
23. David, M.Z. and R.S. Daum, *Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic*. Clinical Microbiology Reviews, 2010. **23**(3): p. 616-+.

24. Zinkant, K., *Antibiotika-Strategie der Regierung: „Viele Dinge daran sind zweifelhaft“*. Süddeutsche Zeitung 2015. <http://www.sueddeutsche.de/gesundheit/gerd-faetkenheuer-gefahr-fuer-die-patienten-1.2516085>.
25. Hackenbroch, V., *Pharma: Kapital gegen Keime*. Spiegel Online, 2015. <http://www.spiegel.de/spiegel/print/d-135322494.html>.
26. joe/dpa/Reuters, *Studie zu Todesursachen: Resistente Keime bald gefährlicher als Krebs*. Spiegel Online, 2015. <http://www.spiegel.de/gesundheit/diagnose/multiresistente-keime-mehr-tote-durch-keime-als-durch-krebs-a-1036778.html>.
27. Maier-Borst, H., *Gefährliche Keime: Sogar Erfolge werden verschwiegen* ZEIT Wissen, 2015. <http://www.zeit.de/wissen/gesundheit/2015-05/mrsa-keime-rki-daten-kreischa>.
28. Sam, *Lebensmittel: Hähnchenfleisch voller Keime* Spiegel Online, 2015. <http://www.spiegel.de/spiegel/print/d-135105147.html>.
29. Becker, K.B., *Antibiotika-Einsatz: Regierung beschließt Strategie gegen resistente Keime*. Süddeutsche Zeitung, 2015. <http://www.sueddeutsche.de/gesundheit/antibiotika-regierung-beschliesst-strategie-gegen-resistente-keime-1.2477893>.
30. Merlot, J., *Gefährliche Infektionen: Antibiotikum tötet resistente Keime*. Spiegel Online 2015. <http://www.spiegel.de/wissenschaft/medizin/neues-antibiotikum-entwickelt-keine-resistenzen-a-1011455.html>.
31. wbr/Lena Klimkeit, d., *Krankenhaushygiene: Tausende Todesfälle durch resistente Keime*. Spiegel Online, 2015. <http://www.spiegel.de/gesundheit/diagnose/antibiotika-tausende-todesfaelle-durch-resistente-keime-a-1027947.html>.
32. Passarge, G., *Moderne Medizin in München: Süßer Verband gegen Keime*. Süddeutsche Zeitung, 2015. <http://www.sueddeutsche.de/muenchen/sz-serie-die-gesundmacher-suesser-verband-1.2416972>.
33. Polke-Majewski, K., *Multiresistente Keime: Zögert nicht, es geht um Menschenleben*. ZEIT Wissen, 2015. <http://www.zeit.de/wissen/gesundheit/2015-03/multiresistente-keime-gesundheit-ministerium-groehe>.
34. Dambeck, H., *Infektionen: Wie Bakterien im Krankenhaus wandern*. Spiegel Online, 2015. <http://www.spiegel.de/wissenschaft/medizin/kontaktsensoren-enthuellen-infektionswege-im-krankenhaus-a-1024436.html>.
35. Hackenbroch, V., *Schlimmer als Ebola und Vogelgrippe* Spiegel Online, 2015. <http://www.spiegel.de/spiegel/print/d-131578974.html>.
36. Gerhard, S., *Keime im Krankenhaus: Für Gesunde harmlos, in Kliniken tödlich*. ZEIT Wissen, 2015. <http://www.zeit.de/wissen/gesundheit/2015-01/keime-im-krankenhaus-uniklinik-kiel>.
37. Hahn, T., *Krankenhäuser: „Aktion gefragt“ gegen multiresistente Keime*. Süddeutsche Zeitung, 2015. <http://www.sueddeutsche.de/panorama/krankenhaeuser-aktion-gefragt-gegen-multiresistente-keime-1.2323760>.
38. RKI, *Kontrolle der Weiterverbreitung von MRSA - Personal im Gesundheitsdienst als Carrier*. Epidemiologisches Bulletin 36/2008, 2008.
39. RKI, *"Aktion Saubere Hände": Keine Chance den Krankenhausinfektionen!* Epidemiologisches Bulletin 34/2008, 2008.
40. Kampf, G., H. Loeffler, and P. Gastmeier, *Hand Hygiene for the Prevention of Nosocomial Infections*. Deutsches Arzteblatt International, 2009. **106**(40): p. 649-U21.
41. Buehlmann, M., et al., *Highly effective regimen for decolonization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus carriers*. Infection Control and Hospital Epidemiology, 2008. **29**(6): p. 510-516.
42. RKI, *Maßnahmen zur Händehygiene - Ein Beitrag zum Internationalen Tag der Händehygiene am 5.5*. Epidemiologisches Bulletin 17/2012, 2012.

43. Pullen, L., *Landmark CDC Report Details Threat of "Postantibiotic Era"*. Medscape Medical News, Sep 16, 2013.
44. Kåhrström, C.T., *In The News: Entering a post-antibiotic era?* Nature Reviews Microbiology, MAR 2013. **11**: p. 146.
45. Jori, G. and S.B. Brown, *Photosensitized inactivation of microorganisms*. Photochemical & Photobiological Sciences, 2004. **3**(5): p. 403-405.
46. Maisch, T., et al., *Photodynamic inactivation of multi-resistant bacteria (PIB) - a new approach to treat superficial infections in the 21st century*. Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 2011. **9**(5): p. 360-366.
47. Gonzales, F.P. and T. Maisch, *Photodynamic inactivation of microorganisms as an innovative approach to kill mucocutaneous and skin microorganisms*. Giornale Italiano Di Dermatologia E Venereologia, 2010. **145**(4): p. 477-489.
48. Hamblin, M.R., *Antimicrobial Photodynamic Therapy and Photodynamic Inactivation, or Killing Bugs with Dyes and Light-A Symposium-in-Print*. Photochemistry and Photobiology, 2012. **88**(3): p. 496-498.
49. Jori, G., et al., *Antimicrobial Photodynamic Therapy: Basic Principles*. Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and Environmental Applications, ed. M.R. Hamblin and G. Jori. Vol. 11. 2011. 1,3-18.
50. Huang, L., T. Dai, and M.R. Hamblin, *Antimicrobial Photodynamic Inactivation and Photodynamic Therapy for Infections*, in *Photodynamic Therapy: Methods and Protocols*, C.J. Gomer, Editor 2010. p. 155-173.
51. Maisch, T., et al., *The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(17): p. 7223-7228.
52. Baier, J., et al., *Time-resolved investigations of singlet oxygen luminescence in water, in phosphatidylcholine, and in aqueous suspensions of phosphatidylcholine or HT29 cells*. The journal of physical chemistry. B, 2005. **109**(7): p. 3041-6.
53. Raab, O., *Ueber die Wirkung Fluoreszierender Stoffe auf Infusorien*. . Z.Biol., 1904. **39**: p. 23.
54. Tappeiner, H.v., *Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen*. Münch. Med. Wochenschau, 1903: p. 2042-2044.
55. Tappeiner, H.v., *Über die Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Protozoen und Enzyme*. Dtsch. Arch. Klin. Med. , 1904. **80**: p. 61.
56. Moan, J. and Q. Peng, *An outline of the hundred-year history of PDT*. Anticancer Research, 2003. **23**(5A): p. 3591-3600.
57. Hamzavi, I.H., H.W. Lim, and Z.U. Syed, *Ultraviolet-based therapy for vitiligo: What's new?* Indian Journal of Dermatology Venereology & Leprology, 2012. **78**(1): p. 42-48.
58. Agostinis, P., et al., *Photodynamic Therapy of Cancer: An Update*. Ca-a Cancer Journal for Clinicians, 2011. **61**(4): p. 250-281.
59. Dougherty, T.J., *An update on photodynamic therapy applications*. Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery, 2002. **20**(1): p. 3-7.
60. Garcia-Zuazaga, J., K.D. Cooper, and E.D. Baron, *Photodynamic therapy in dermatology: current concepts in the treatment of skin cancer*. Expert Review of Anticancer Therapy, 2005. **5**(5): p. 791-800.
61. Kato, H., *Photodynamic therapy for lung cancer - A review of 19 years' experience*. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 1998. **42**(2): p. 96-99.
62. Dai, T., Y.-Y. Huang, and M.R. Hamblin, *Photodynamic therapy for localized infections-State of the art*. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2009. **6**(3-4): p. 170-188.
63. Denis, T.G.S., et al., *All you need is light Antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease*. Virulence, 2011. **2**(6): p. 509-520.

64. Konopka, K. and T. Goslinski, *Photodynamic therapy in dentistry*. Journal of Dental Research, 2007. **86**(8): p. 694-707.
65. *Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and Environmental Applications*. Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and Environmental Applications, ed. M.R. Hamblin and G. Jori. Vol. 11. 2011.
66. Cieplik, F., et al., *Photodynamic biofilm inactivation by SAPYR—An exclusive singlet oxygen photosensitizer*. Free Radical Biology and Medicine, 2013. **65**(0): p. 477-487.
67. Spaeth, A., et al., *Improving Photodynamic Inactivation of Bacteria in Dentistry: Highly Effective and Fast Killing of Oral Key Pathogens with Novel Tooth-Colored Type-II Photosensitizers*. Journal of Medicinal Chemistry, 2014. **57**(12): p. 5157-5168.
68. Biel, M.A., *Photodynamic Therapy of Bacterial and Fungal Biofilm Infections*, in *Photodynamic Therapy: Methods and Protocols*, C.J. Gomer, Editor 2010. p. 175-194.
69. Wilson, M., T. Burns, and J. Pratten, *Killing of Streptococcus sanguis in biofilms using a light-activated antimicrobial agent*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1996. **37**(2): p. 377-381.
70. Taraszkievicz, A., et al., *Innovative strategies to overcome biofilm resistance*. BioMed research international, 2013. **2013**: p. 150653-150653.
71. Aveline, B., *Primary Processes in Photosensitization mechanisms*. Comprehensive Series in Photoscience. Vol. 2. 2001.
72. Schenck, K.G.G.O., *Mechanism and Stereoselectivity of Photosensitized Oxygen Transfer Reactions*.
73. Kilger, R., et al., *Bidirectional energy transfer between the triplet T-1 state of photofrin and singlet oxygen in deuterium oxide*. Chemical Physics Letters, 2001. **343**(5-6): p. 543-548.
74. Foote, C.S., *Photosensitized Oxidation and Singlet Oxygen: Consequences in Biological Systems*, in *Free Radicals in Biology*, W.A. Pryor, Editor 1976, ACADEMIC PRESS, INC. .
75. Midden, W.R. and S.Y. Wang, *SINGLET OXYGEN GENERATION FOR SOLUTION KINETICS - CLEAN AND SIMPLE*. Journal of the American Chemical Society, 1983. **105**(13): p. 4129-4135.
76. Goncalves, P.J., et al., *Effects of environment on the photophysical characteristics of mesotetrakis methylpyridiniumyl porphyrin (TMPyP)*. Spectrochimica Acta Part a- Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2011. **79**(5): p. 1532-1539.
77. Dahl, T.A., W.R. Midden, and P.E. Hartman, *PURE SINGLET OXYGEN CYTOTOXICITY FOR BACTERIA*. Photochemistry and Photobiology, 1987. **46**(3): p. 345-352.
78. Wilkinson, F., W.P. Helman, and A.B. Ross, *RATE CONSTANTS FOR THE DECAY AND REACTIONS OF THE LOWEST ELECTRONICALLY EXCITED SINGLET-STATE OF MOLECULAR-OXYGEN IN SOLUTION - AN EXPANDED AND REVISED COMPILATION*. Journal of Physical and Chemical Reference Data, 1995. **24**(2): p. 663-1021.
79. Spannberger, F.R., *Einfluss einer IPL-Blitzlichtlampe auf die photodynamische Inaktivierung von Bakterien und Wirkung des Hitzeschockproteins DnaK auf die photodynamische Suszeptibilität von E.coli in vitro* 2014.
80. Merchat, M., et al., *Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria*. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 1996. **32**(3): p. 153-157.
81. Jori, G., et al., *Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications*. Lasers in Surgery and Medicine, 2006. **38**(5): p. 468-481.
82. Maisch, T., et al., *Antibacterial photodynamic therapy. A new treatment for bacterial skin diseases?* Hautarzt, 2005. **56**(11): p. 1048-1055.

83. Minnock, A., et al., *Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both gram-negative and gram-positive bacteria.* Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 1996. **32**(3): p. 159-164.
84. Gelfuso, G.M., et al., *The influence of positive or negative charges in the passive and iontophoretic skin penetration of porphyrins used in photodynamic therapy.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2011. **77**(2): p. 249-256.
85. Merchat, M., et al., *Studies on the mechanism of bacteria photosensitization by meso-substituted cationic porphyrins.* Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 1996. **35**(3): p. 149-157.
86. Detty, M.R., S.L. Gibson, and S.J. Wagner, *Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy.* Journal of Medicinal Chemistry, 2004. **47**(16): p. 3897-3915.
87. Maisch, T., et al., *Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005. **49**(4): p. 1542-1552.
88. Eichner, A., et al., *Dirty hands: photodynamic killing of human pathogens like EHEC, MRSA and Candida within seconds.* Photochemical & Photobiological Sciences, 2012. **12**(1): p. 135-147.
89. Maisch, T., et al., *Fast and effective: intense pulse light photodynamic inactivation of bacteria.* Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2012. **39**(7): p. 1013-1021.
90. Oliveira, A., et al., *Porphyrin derivatives as photosensitizers for the inactivation of Bacillus cereus endospores.* Journal of Applied Microbiology, 2009. **106**(6): p. 1986-1995.
91. Encyclopaedia Britannica Online *porphyrin.*
<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/470697/porphyrin>, 2013.
92. Mižoch, L., *chemical structure Porphyrin.* Wikipedia
<http://en.wikipedia.org/wiki/Porphyrin>, 2006.
93. Kraus, M., *Photophysical investigation of a new generation of porphyrin derivatives*, in *Department of Dermatology* 2013, University of Regensburg.
94. Redmond, R.W. and J.N. Gamlin, *A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules.* Photochemistry and Photobiology, 1999. **70**(4): p. 391-475.
95. Frederiksen, P.K., et al., *Two-photon photosensitized production of singlet oxygen in water.* Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(1): p. 255-269.
96. Maisch, T., et al., *Determination of the antibacterial efficacy of a new porphyrin-based photosensitizer against MRSA ex vivo.* Photochemical & Photobiological Sciences, 2007. **6**(5): p. 545-551.
97. Meyer, W., N.H. Zschemisch, and K. Neurand, *Investigations in the structure of the ear skin in the domesticated pig, with special reference to the use for human dermatological research: 1. Macroscopical aspects and hair coat.* Berliner Und Munchener Tierärztliche Wochenschrift, 2001. **114**(3-4): p. 92-99.
98. Meyer, W., et al., *Investigations in the structure of the ear skin in the domesticated pig, with special reference to the use for human dermatological research: 2. Specific histology of the integument.* Berliner Und Munchener Tierärztliche Wochenschrift, 2001. **114**(3-4): p. 100-111.
99. Simon, G.A. and H.I. Maibach, *The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: Qualitative and quantitative observations - An overview.* Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology, 2000. **13**(5): p. 229-234.
100. wikipedia.de, *Zellschichten menschlicher Epidermis.*
https://de.wikipedia.org/wiki/Epidermis_%28Wirbeltiere%29#/media/File:Skinlayers.png, 2006.
101. Worlicek, C., *FLUORESZENZINDUKTION UND RELATIVES PENETRATIONSVERHALTEN VERSCHIEDENER 5 -AMINOLÄVULINSÄURE/METHYLESTER FORMULIERUNGEN AM EX-*

- VIVO SCHWEINEHAUTMODELL in Lehrstuhl für Dermatologie der Medizinischen Fakultät 2008, Universität Regensburg.
102. Maisch, T., et al., *A HCl/alcohol formulation increased 5-aminolevulinic acid skin distribution using an ex vivo full thickness porcine skin model*. Experimental Dermatology, 2008. **17**(10): p. 813-820.
 103. Geffers, C. and P. Gastmeier, *Nosocomial infections and multidrug-resistant organisms in Germany—epidemiological data from KISS (The Hospital Infection Surveillance System)*. . Dtsch Arztebl Int 2011; **108**(6): 87–93. .
 104. Herbert Hof, R.D., *Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie*. Vol. 4. Thieme.
 105. <http://www.dojindo.eu.com/store/p/692-TMPyP.aspx>.
 106. Miles, A.A., S.S. Misra, and J.O. Irwin, *The estimation of the bactericidal power of the blood*. The Journal of hygiene, 1938. **38**(6): p. 732-49.
 107. JM1 Boyce, et al., *Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings. Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force*. . MMWR Recomm Rep. 2002 Oct 25; **51**(RR-16):1-45, quiz CE1-4., 2002.
 108. Malik, Z., J. Hanania, and Y. Nitzan, *BACTERICIDAL EFFECTS OF PHOTOACTIVATED PORPHYRINS - AN ALTERNATIVE APPROACH TO ANTIMICROBIAL DRUGS*. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 1990. **5**(3-4): p. 281-293.
 109. Banfi, S., et al., *Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: An in vitro study on Gram negative and Gram positive bacteria*. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 2006. **85**(1): p. 28-38.
 110. Alves, E., et al., *Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins*. BMC Microbiology, 2009. **9**.
 111. Cieplik, F., et al., *The impact of absorbed photons on antimicrobial photodynamic efficacy*. Frontiers in Microbiology, 2015. **6**.
 112. Lipinski, C.A., *Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution*. Drug discovery today. Technologies, 2004. **1**(4): p. 337-41.
 113. Livermore, D.M., *ANTIBIOTIC UPTAKE AND TRANSPORT BY BACTERIA*. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 1991: p. 15-22.
 114. Pereira, M.A., et al., *Influence of external bacterial structures on the efficiency of photodynamic inactivation by a cationic porphyrin*. Photochemical & Photobiological Sciences, 2014. **13**(4): p. 680-690.
 115. Monod, J., *The growth of bacterial cultures*. . Microbiol. 1949.3:371-394., 1949.
 116. Peterson, B., et al., *Bacterial Cell Surface Damage Due to Centrifugal Compaction*. Appl Environ Microbiol. 2012 Jan; **78**(1): 120–125. , 2012.
 117. Kiesslich, T., et al., *A Comprehensive Tutorial on In Vitro Characterization of New Photosensitizers for Photodynamic Antitumor Therapy and Photodynamic Inactivation of Microorganisms*. BioMed research international, 2013. **2013**: p. 17.
 118. Mielke, P.D.M. and D.C. Ruscher, *Empfehlungen zur Prävention und Kontrolle von Methicillin-resistenten Staphylococcus aureus-Stämmen (MRSA) in medizinischen und pflegerischen Einrichtungen Aktualisierte Empfehlungen der KRINKO vom Juni 2014*, 2014.
 119. Messenger, S., et al., *Use of the 'ex vivo' test to study long-term bacterial survival on human skin and their sensitivity to antiseptics*. Journal of Applied Microbiology, 2004. **97**(6): p. 1149-1160.
 120. Lambrechts, S.A.G., et al., *Photodynamic inactivation of fibroblasts by a cationic porphyrin*. Lasers in Medical Science, 2005. **20**(2): p. 62-67.
 121. Grinholc, M., et al., *Photodynamic effect of protoporphyrin diarginate (PPArg(2)) on methicillin-resistant Staphylococcus aureus and human dermal fibroblasts*. Acta Biochimica Polonica, 2008. **55**(1): p. 85-90.

122. *Liste der vom Robert Koch-Institut geprüften und anerkannten Desinfektionsmittel und -verfahren*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013, 2013.
123. Vecchio, D., et al., *Antimicrobial photodynamic therapy with RLP068 kills methicillin-resistant Staphylococcus aureus and improves wound healing in a mouse model of infected skin abrasion PDT with RLP068/CI in infected mouse skin abrasion*. J Biophotonics. 2013 Sep;6(9):733-42, 2013.
124. Dai, T., et al., *Photodynamic therapy for methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection in a mouse skin abrasion model*. Lasers Surg Med. 2010 Jan;42(1):38-44, 2010.
125. Morley, S., et al., *Phase IIa randomized, placebo-controlled study of antimicrobial photodynamic therapy in bacterially colonized, chronic leg ulcers and diabetic foot ulcers: a new approach to antimicrobial therapy*. British Journal of Dermatology, 2013. **168**(3): p. 617-624.
126. Richards, S.M., K.L. Strandberg, and J.S. Gunn, *Salmonella-Regulated Lipopolysaccharide Modifications*, in *Endotoxins: Structure, Function and Recognition*, X. Wang and P.J. Quinn, Editors. 2010. p. 101-122.
127. Gruenheid, S. and H. Le Moual, *Resistance to antimicrobial peptides in Gram-negative bacteria*. Fems Microbiology Letters, 2012. **330**(2): p. 81-89.
128. Pfeltz, R.F., et al., *Characterization of passage-selected vancomycin-resistant Staphylococcus aureus strains of diverse parental backgrounds*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000. **44**(2): p. 294-303.
129. Nakonieczna, J., et al., *Superoxide dismutase is upregulated in Staphylococcus aureus following protoporphyrin-mediated photodynamic inactivation and does not directly influence the response to photodynamic treatment*. BMC Microbiology, 2010. **10**.
130. Grinholc, M., et al., *Bactericidal effect of photodynamic inactivation against methicillin-resistant and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus is strain-dependent*. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 2008. **90**(1): p. 57-63.
131. Tavares, A., et al., *Antimicrobial Photodynamic Therapy: Study of Bacterial Recovery Viability and Potential Development of Resistance after Treatment*. Marine Drugs, 2010. **8**(1): p. 91-105.
132. de Melo, W.C.M.A., et al., *Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection*. Expert Review of Anti-Infective Therapy, 2013. **11**(7): p. 669-693.
133. Jonge, L.d., *Inaktivierung von Bakterien auf einer photodynamisch aktiven Oberfläche mittels unterschiedlicher Photosensibilisatoren*, 2013.
134. Felgenträger, A., *Study of Potential Photosensitizers for Self-Disinfecting Surfaces Using the Method of Antimicrobial Photodynamic Action*, in *Lehrstuhl für Dermatologie und Venerologie Fakultät für Medizin* 2013, Universität Regensburg.
135. Almeida, J., et al., *Photodynamic inactivation of multidrug-resistant bacteria in hospital wastewaters: influence of residual antibiotics*. Photochemical & Photobiological Sciences, 2014. **13**(4): p. 626-633.

9 ANHANG

9.1 RESISTENZPROFIL CIPROFLOXACIN RESISTENTER *Escherichia coli* (CIP)

Tabelle 9.1: Resistenzprofil eines klinischen Isolats eines Ciprofloxacin-resistenten *E. coli*; Daten bereitgestellt vom Mikrobiologischen Institut, Universitätsklinikum Regensburg

Antibiotikum	<i>Escherichia coli</i>	
	MHK ²	S/I/R ³
Amikacin	<= 8	S
Amoxicillin/Clavulansäure	<= 4/2	S
Ampicillin	<= 4	S
Aztreonam	<= 2	S
Cefepim	<= 1	S
Cefotaxim		S
Cefoxitin	16	I
Ceftazidim	<= 1	S
Ceftriaxon	<= 1	S
Cefuroxim	16	I
Cefalotin	>16	R
Ciprofloxacin	>2	R
Ertapenem	<= 0.25	S
Gentamicin	>8	R
Imipenem	<= 1	S
Levofloxacin	>4	R
Meropenem	<= 1	S
Nitrofurantoin	<= 16	S
Piperacillin/Tazobactam	<= 4/4	S
Trimethoprim/Sulfamethoxazol	<= 1/19	S

² MHK = minimale Hemmkonzentration in mg/l

³ S = sensibel, I = intermediär, R = resistent

9.2 GRAFISCHE DARSTELLUNGEN DER PHOTOTOXIZITÄTSTESTS IN VITRO

9.2.1 TMPyP

Abb. 9.1: TMPyP mit *E. coli* und CIP, IZ = 30 s, BZ = 10 s

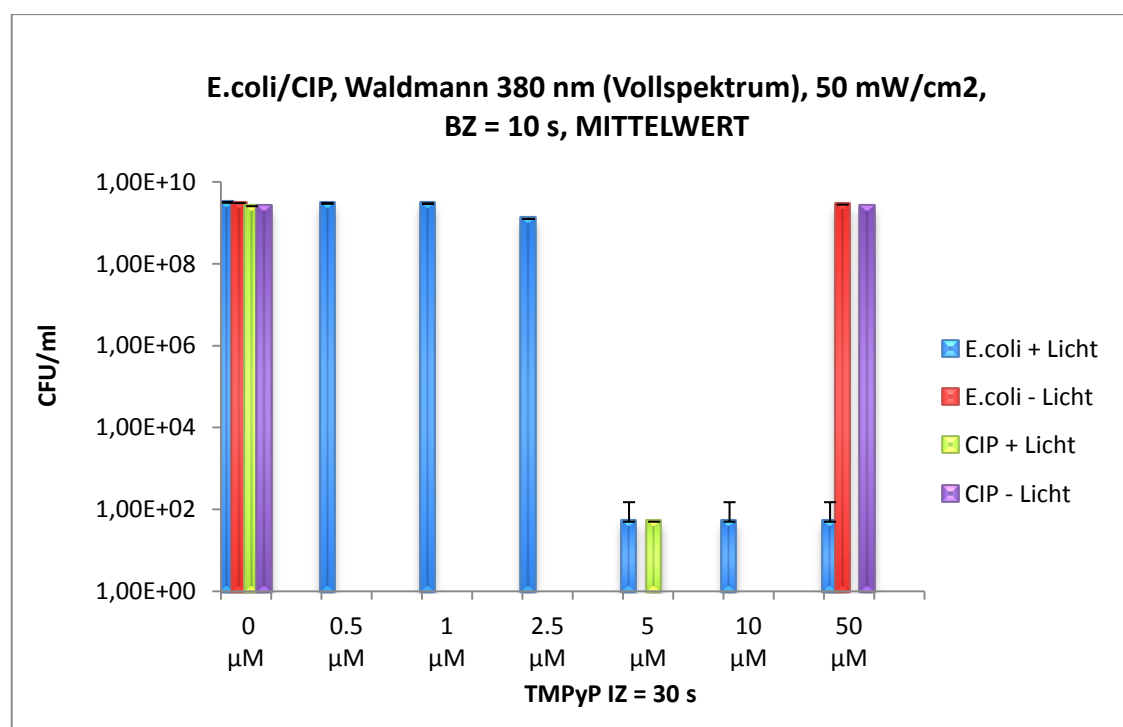


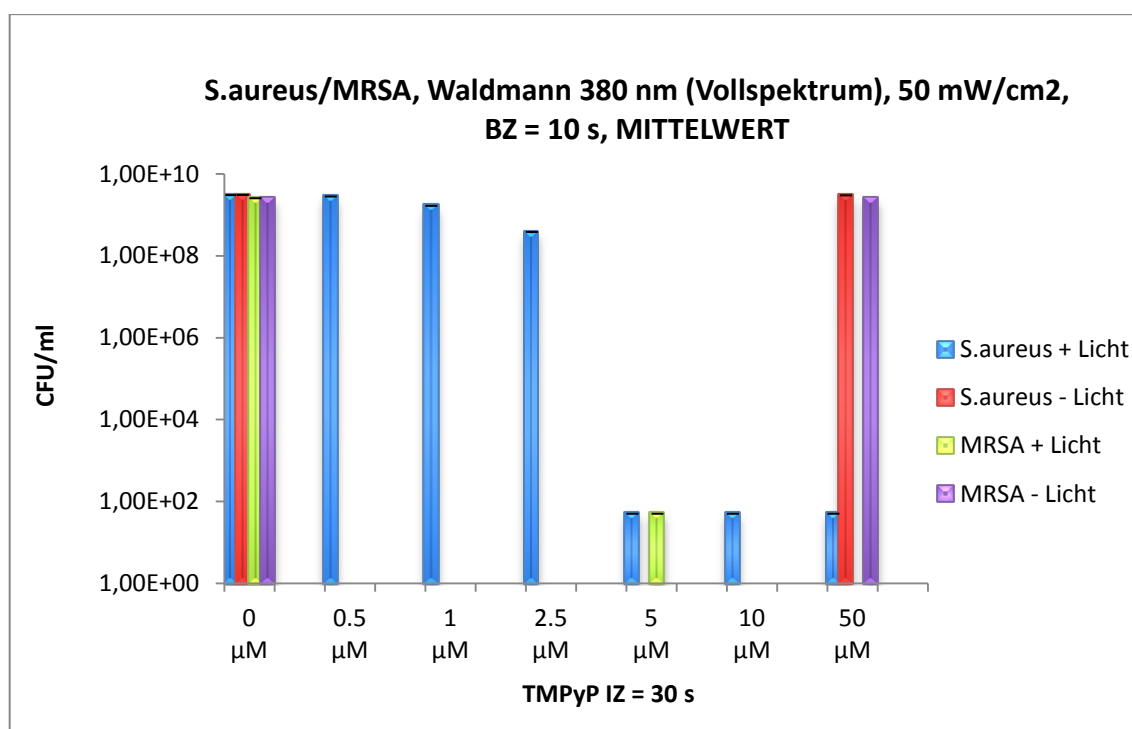
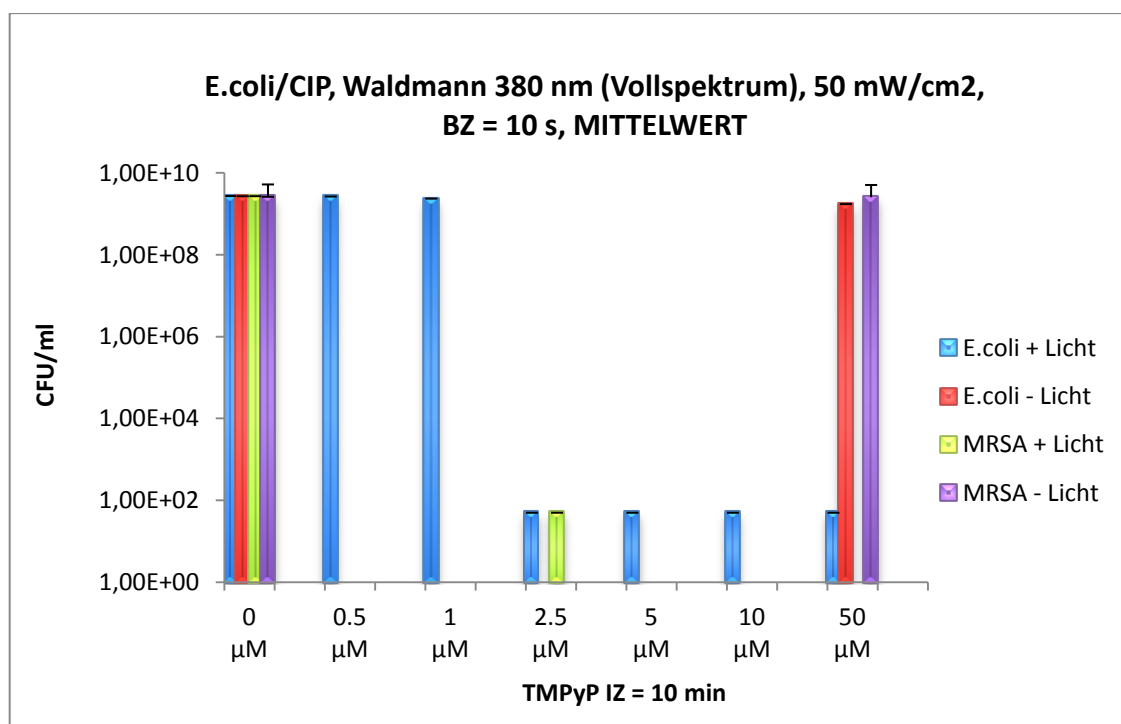
Abb. 9.2: TMPyP mit *S. aureus* und MRSA, IZ = 30 s, BZ = 10 s**Abb. 9.3:** TMPyP mit *E. coli* und CIP, IZ = 10 min, BZ = 10 s

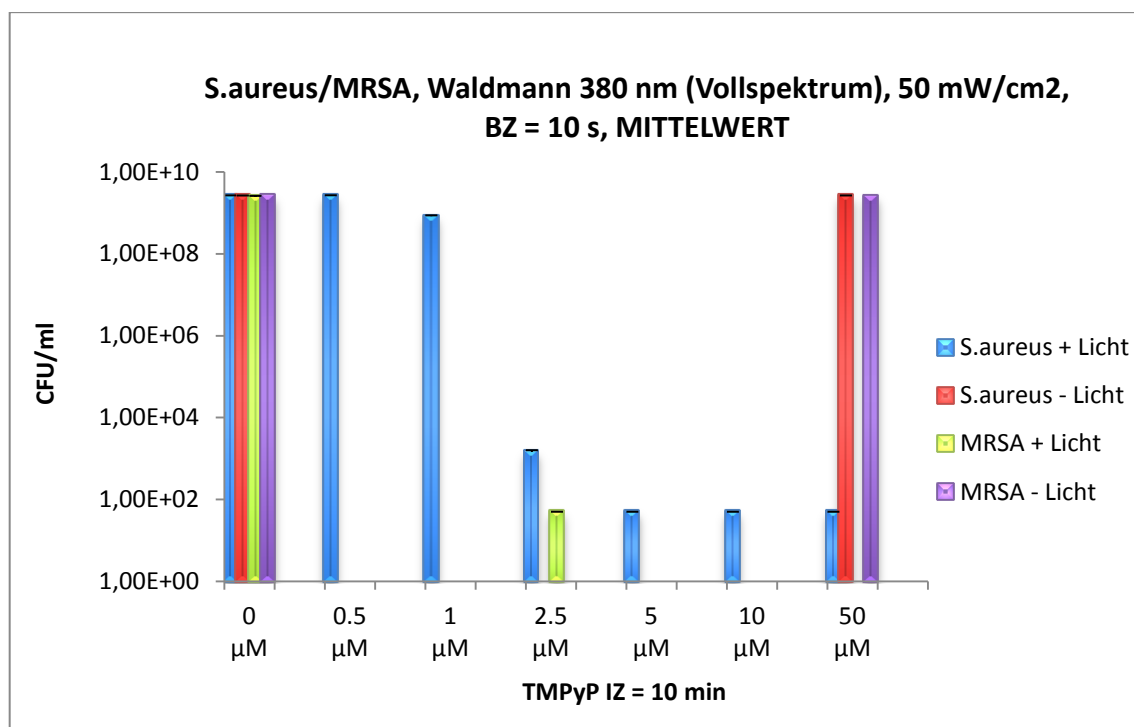
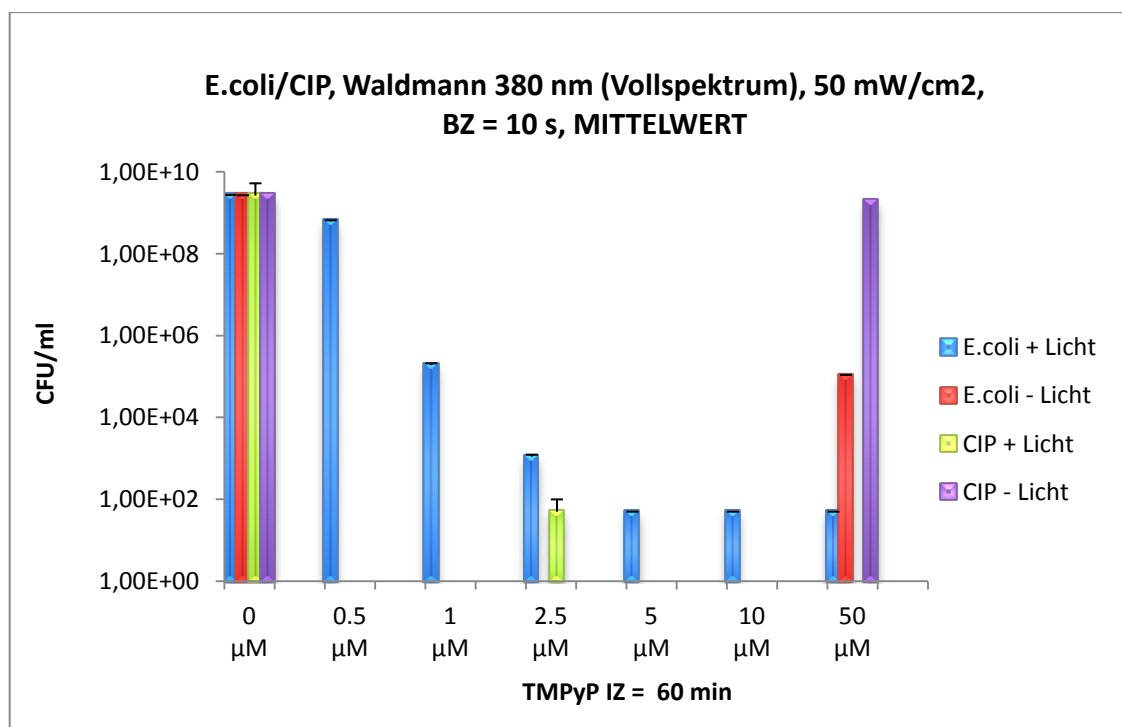
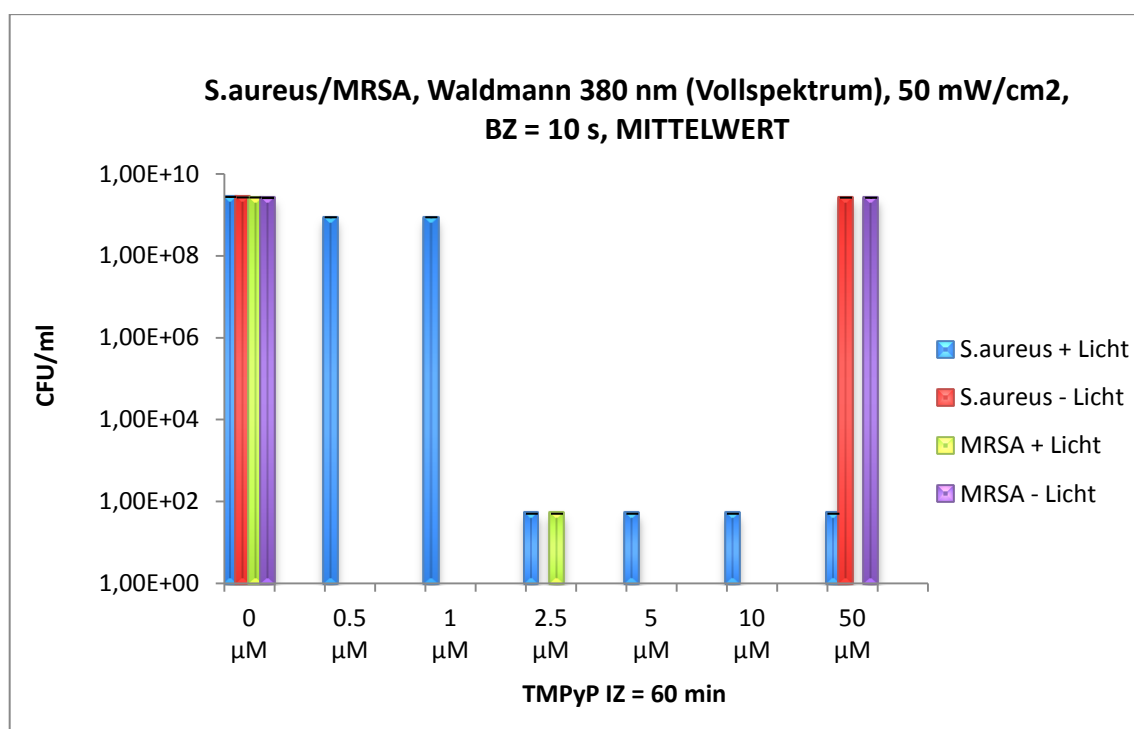
Abb. 9.4: TMPyP mit *S. aureus* und MRSA, IZ = 10 min, BZ = 10 s**Abb. 9.5:** TMPyP mit *E. coli* und CIP, IZ = 60 min, BZ = 10 s

Abb. 9.6: TMPyP mit *S. aureus* und MRSA, IZ = 60 min, BZ = 10 s

9.2.2 TPyP 8+A

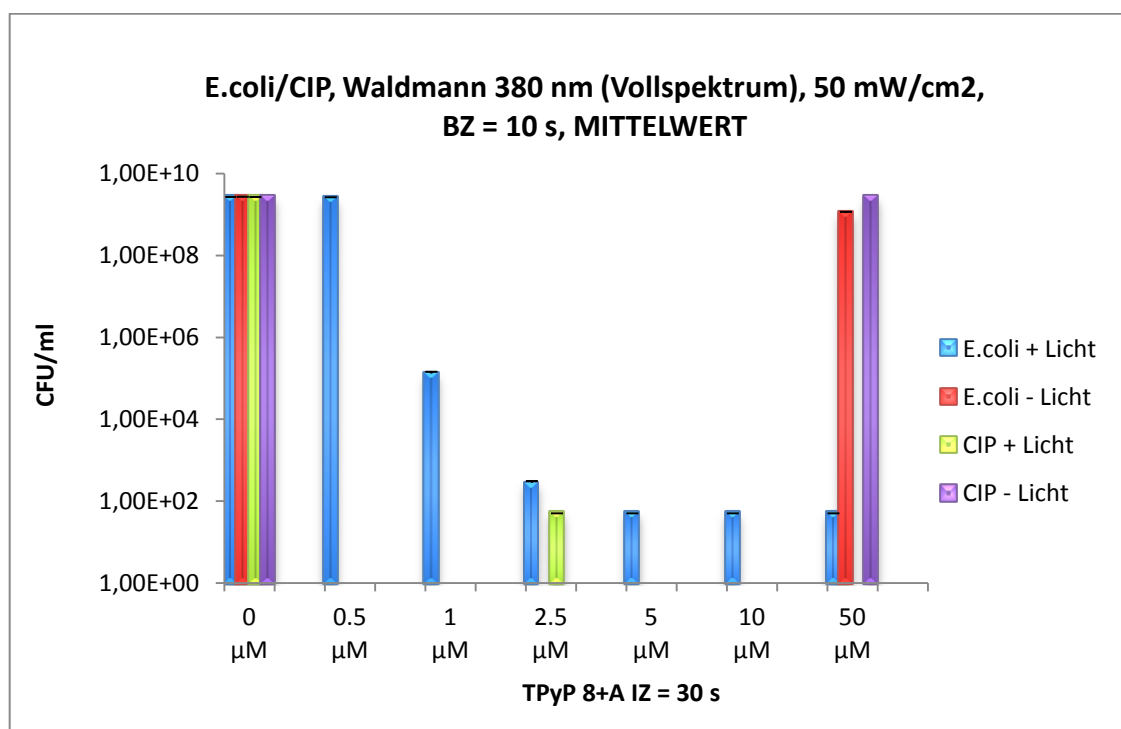
Abb. 9.7: TPyP 8+A mit *E. coli* und CIP, IZ = 30 s, BZ = 10 s

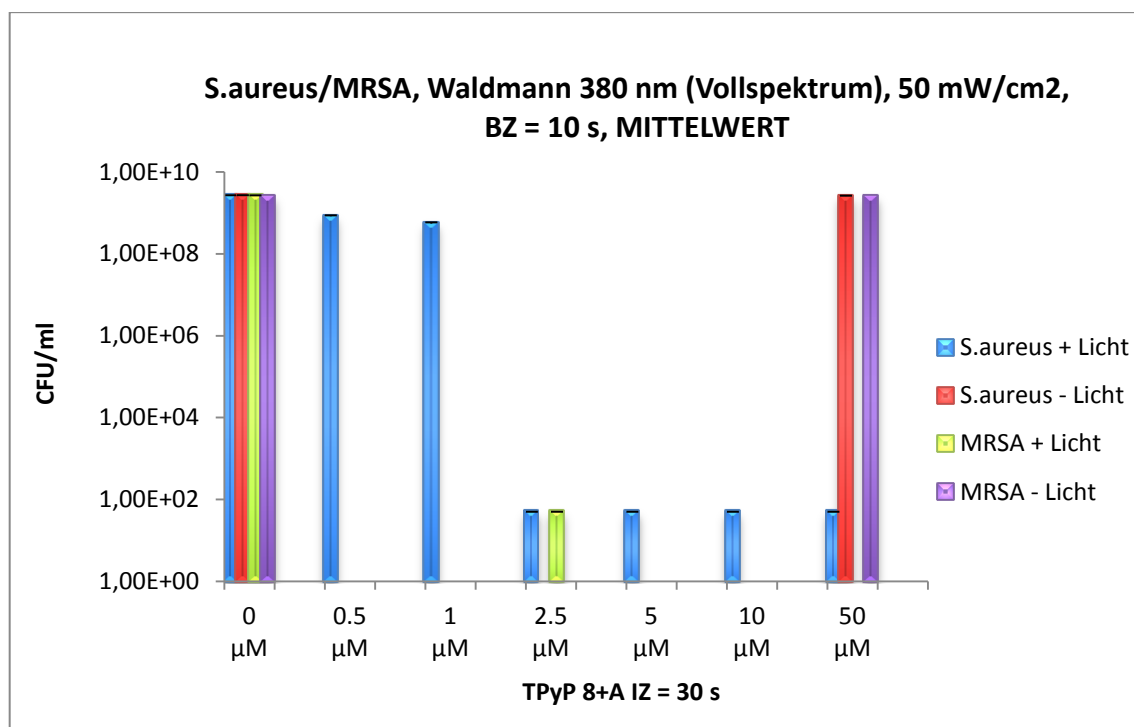
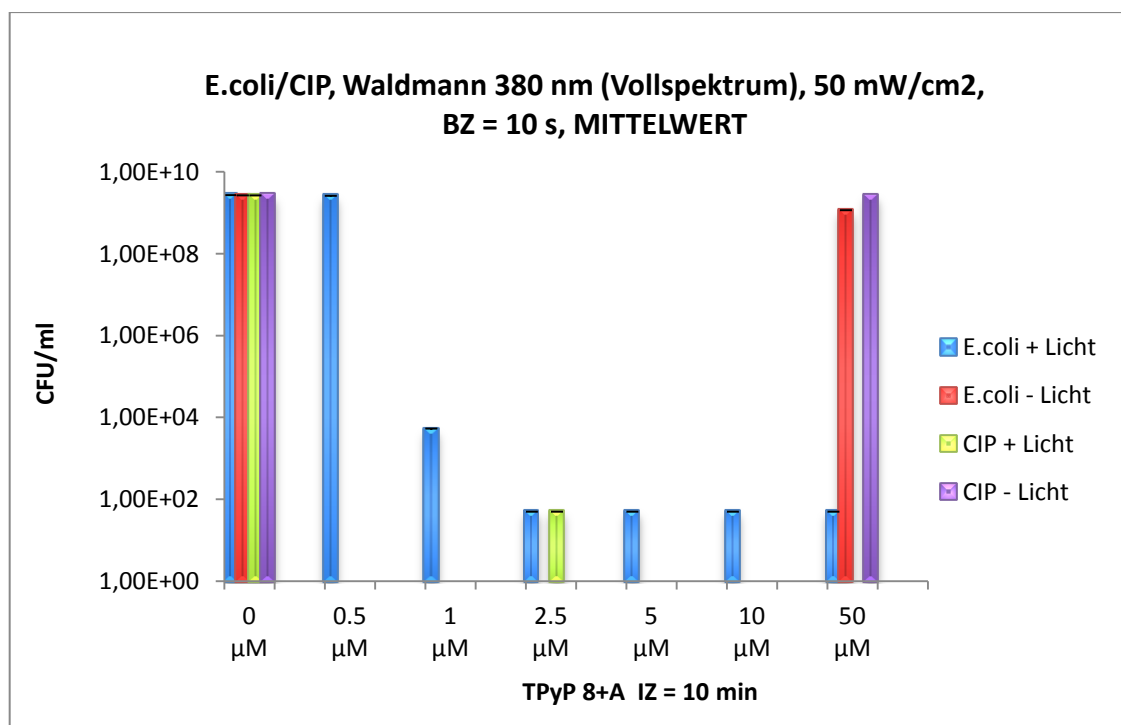
Abb. 9.8: TPyP 8+A mit *S. aureus* und MRSA, IZ = 30 s, BZ = 10 s**Abb. 9.9:** TPyP 8+A mit *E. coli* und CIP, IZ = 10 min, BZ = 10 s

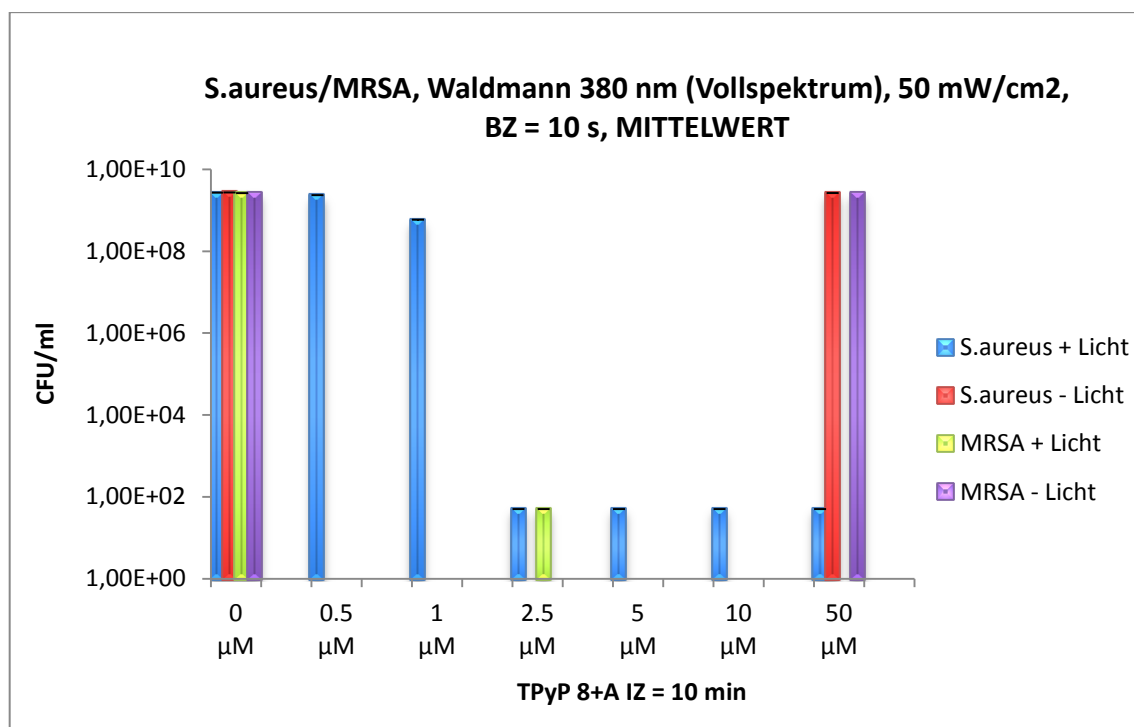
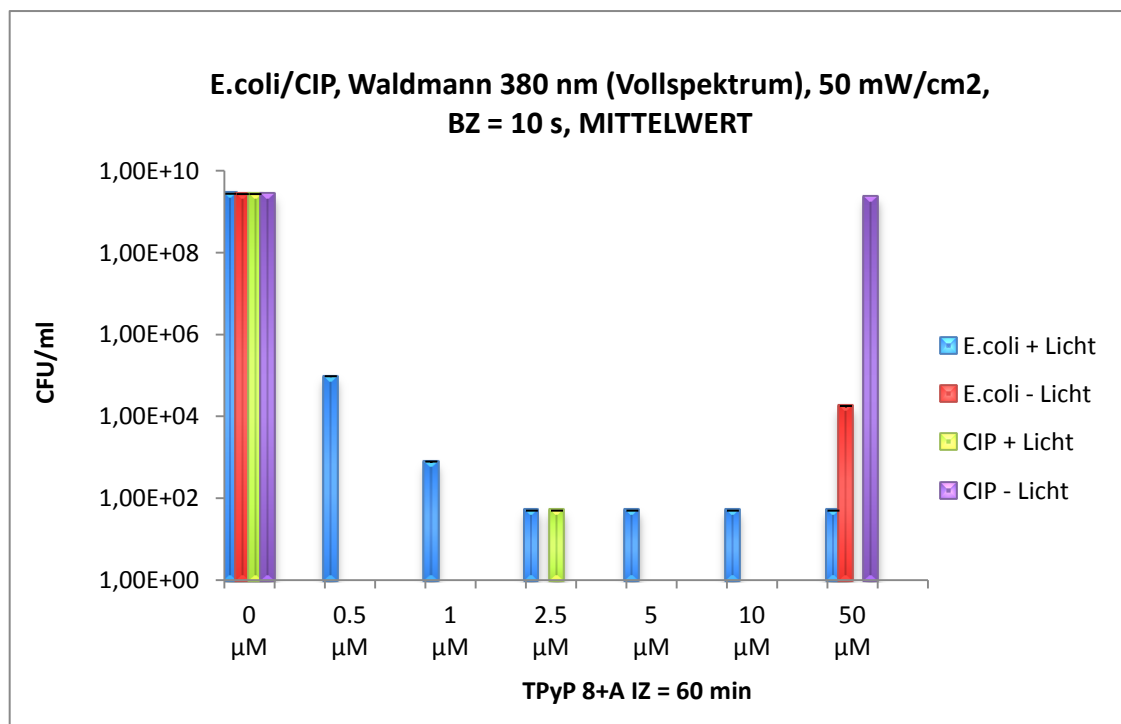
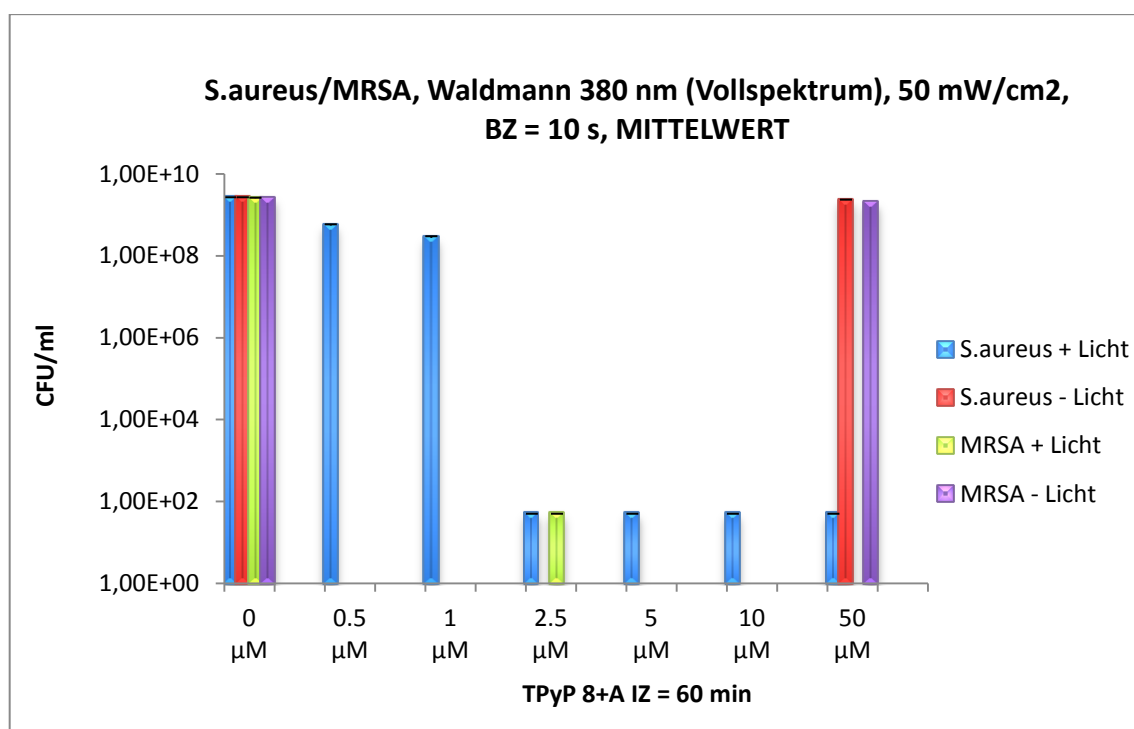
Abb. 9.10: TPyP 8+A mit *S. aureus* und MRSA, IZ = 10 min, BZ = 10 s**Abb. 9.11:** TPyP 8+A mit *E. coli* und CIP, IZ = 60 min, BZ = 10 s

Abb. 9.12: TPyP 8+A mit *S. aureus* und MRSA, IZ = 60 min, BZ = 10 s

9.2.3 TPyP 8+B

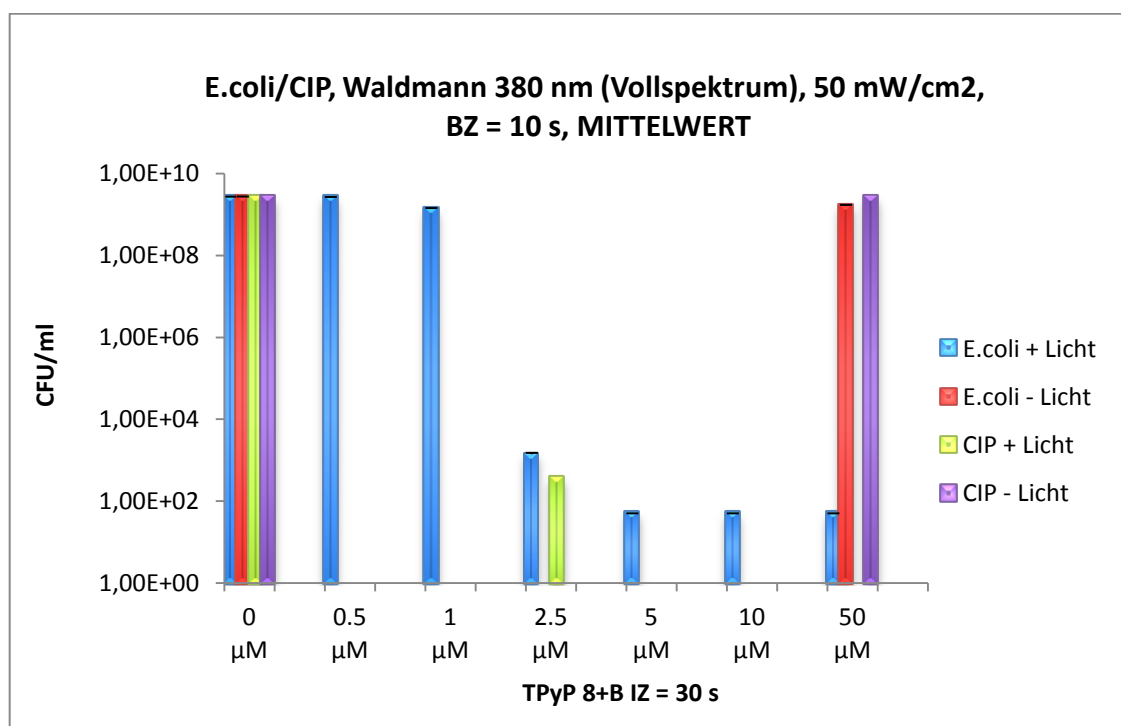
Abb. 9.13: TPyP 8+B mit *E. coli* und CIP, IZ = 30 s, BZ = 10 s

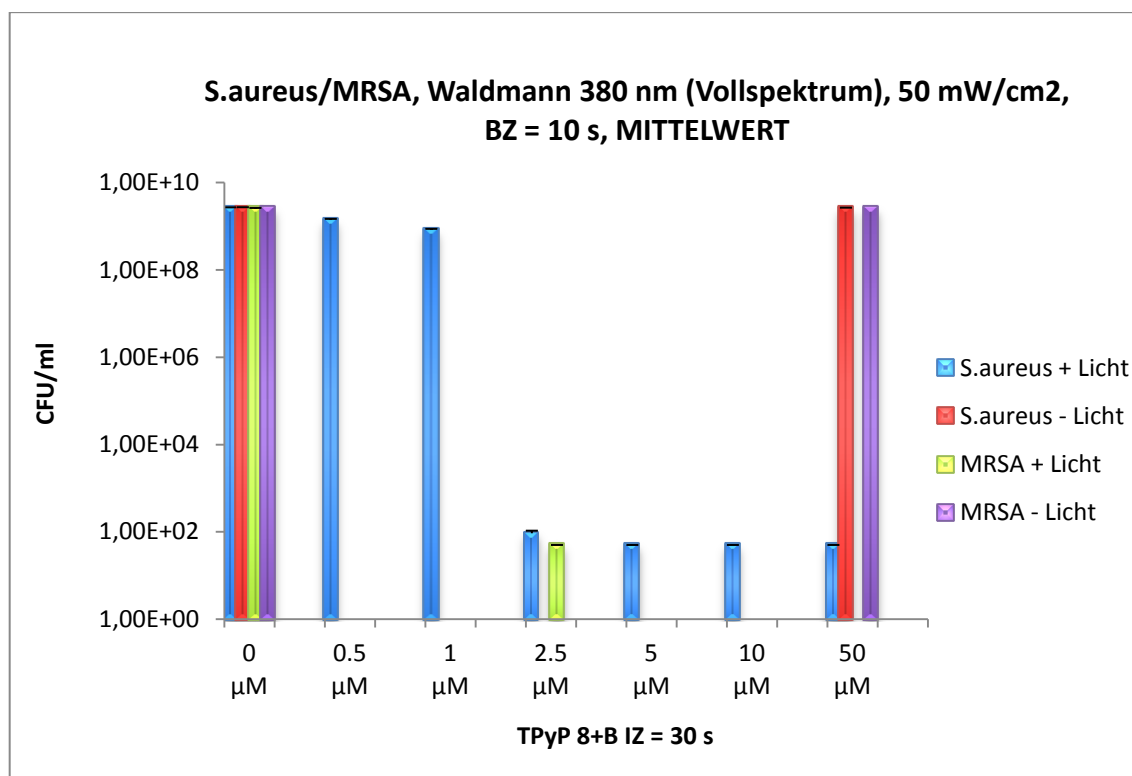
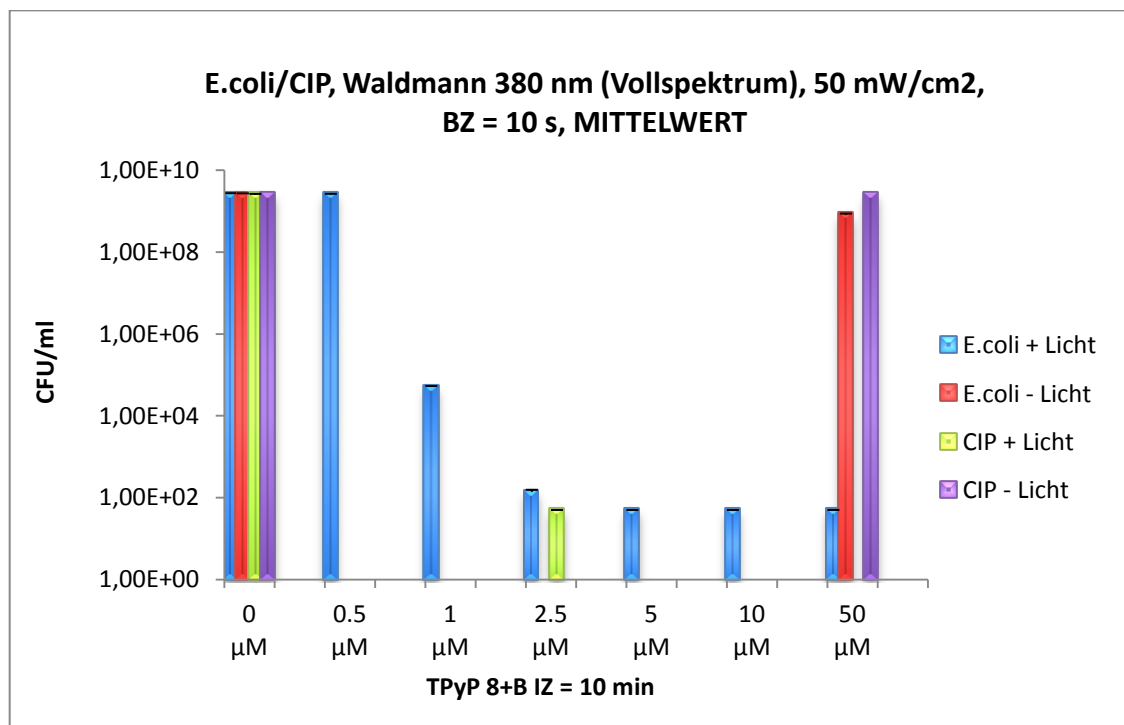
Abb. 9.14: TPyP 8+B mit *S. aureus* und MRSA, IZ = 30 s, BZ = 10 s**Abb. 9.15:** TPyP 8+B mit *E. coli* und CIP, IZ = 10 min, BZ = 10 s

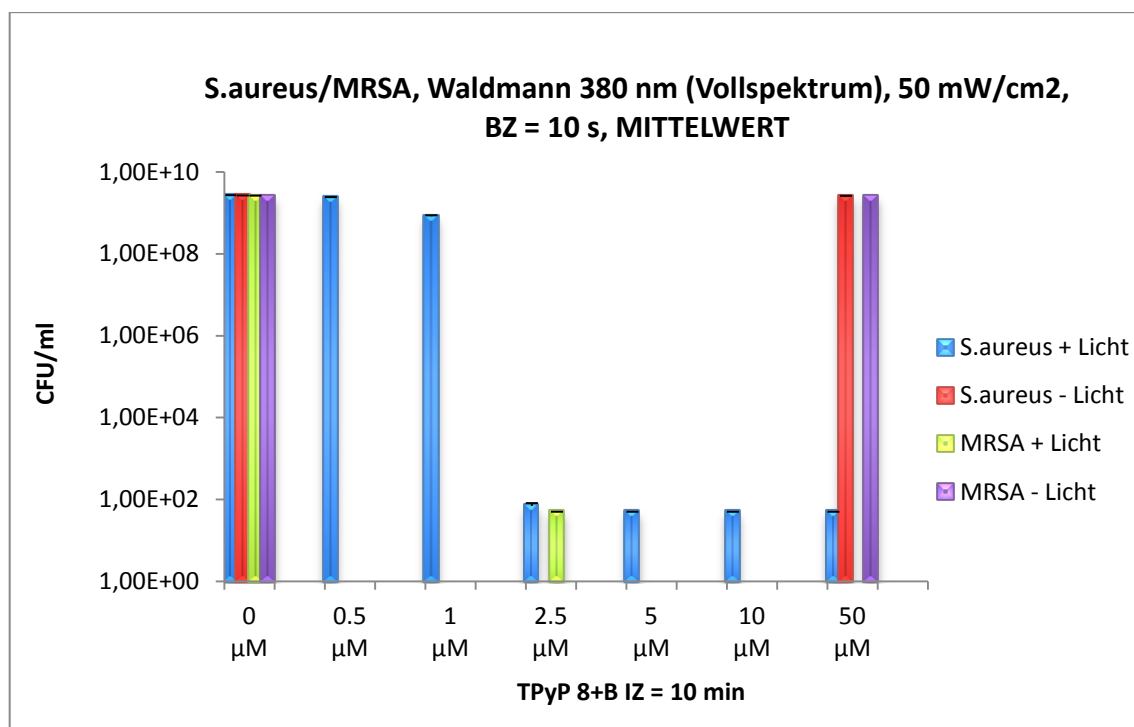
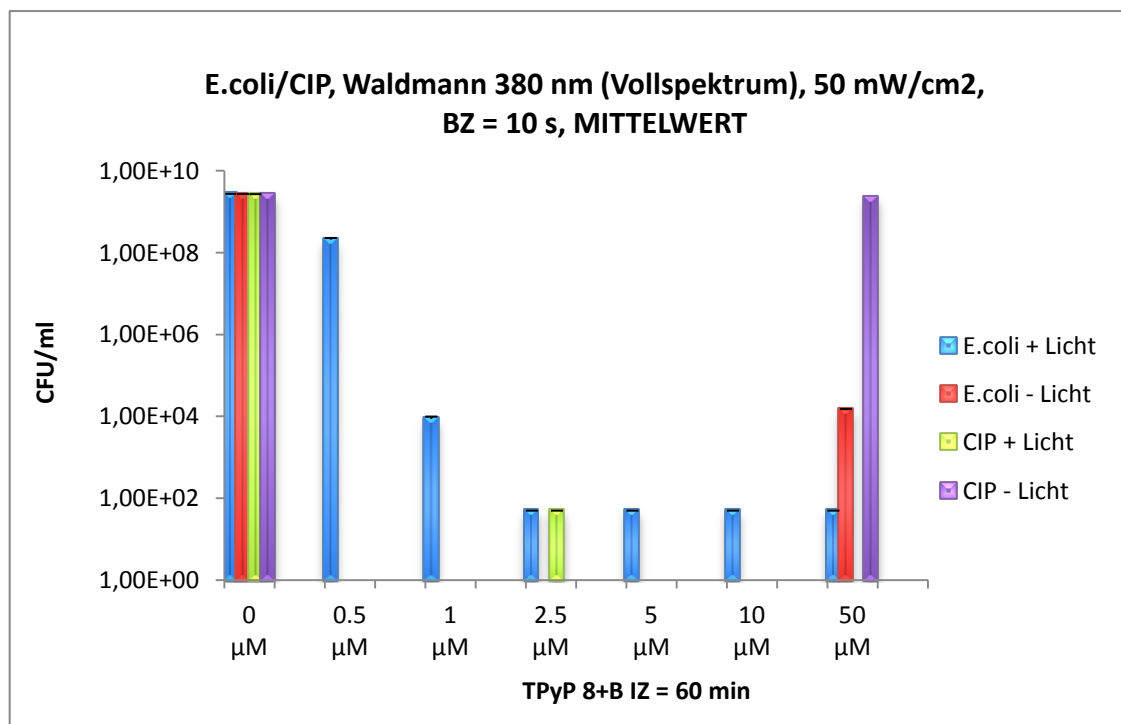
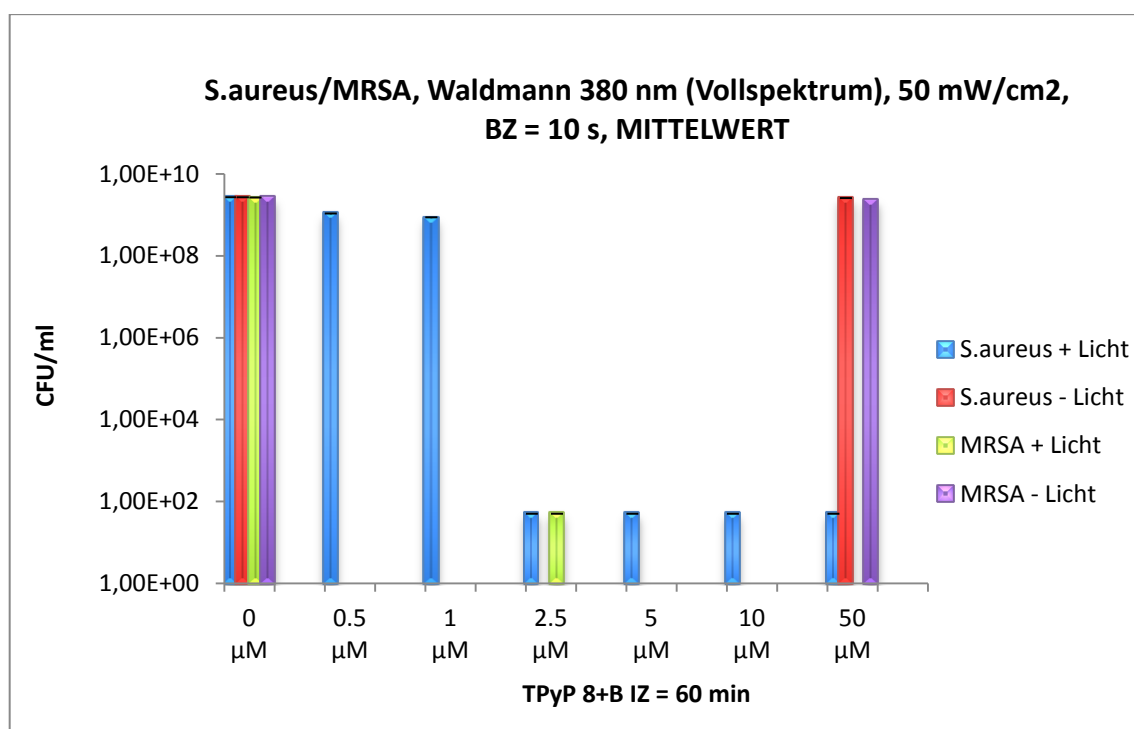
Abb. 9.16: TPyP 8+B mit *S. aureus* und MRSA, IZ = 10 min, BZ = 10 s**Abb. 9.17:** TPyP 8+B mit *E. coli* und CIP, IZ = 60 min, BZ = 10 s

Abb. 9.18: TPyP 8+B mit *S. aureus* und MRSA, IZ = 60 min, BZ = 10 s

Danksagung

Auf diesem Weg möchte ich mich bei allen bedanken, durch deren Hilfe und Unterstützung diese Arbeit möglich wurde.

Mein herzlicher Dank geht insbesondere an PD Dr. Tim Maisch für die Bereitstellung des Promotionsthemas und der hervorragenden Betreuung der Doktorarbeit. Er zeigte während der gesamten Promotionsarbeit eine unglaubliche Geduld in allen Belangen der Labor- und Bearbeitungszeit, um mir mit meinen Fragen und Problemen zu helfen.

Ich möchte mich auch sehr herzlich bei Dr. Anita Gollmer für die Einarbeitung in die Thematik sowie ebenfalls für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit und für die Hilfestellung bedanken, für die sie sich immer sehr viel Zeit genommen hat. Dadurch hat sie mir wissenschaftliches Arbeiten ein Stück näher gebracht.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Wolfgang Bäumler für die Möglichkeit, Teil dieser Arbeitsgruppe zu werden.

Dr. Ariane Felgenträger danke ich für die freundschaftliche Unterstützung und die Einführung in die Arbeitsgruppe sowie für die vielen geduldigen Erklärungen über Physik und die guten Gespräche.

Mein herzlicher Dank gilt dem gesamten Forschungsteam für die schöne Zeit: Petra Unger, Ewa Kowalewski, Johannes Regensburger, Judith Ritzer, Anja Eichner, Judith Heider, Alena Knak und Eva Peterhof. Dr. Andreas Späth danke für die Bereitstellung der Farbstoffe sowie für die Unterstützung und Hilfestellung für alle chemischen Fragestellungen.

Mein besonderer Dank geht an meine Eltern, denen ich für die Unterstützung in allen Belangen während meiner Ausbildung danken möchte.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet. Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 25.01.2016

Friederike Wenk

